



Effekte zweier mtDNA-Punktmutationen des OXPHOS-Systems auf die mitochondriale Funktion und den Metabolismus im Alterungsprozess von Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Bereich der Biowissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Rostock, Februar 2020

vorgelegt von:

Susanne Schröder, geboren am 21.12.1984 in Berlin

aus Rostock



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Simone E. Baltrusch, Universitätsmedizin, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Mikrobiologie

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Mitochondrium | 1 |
| 1.2 Mitochondriale DNA | 2 |
| 1.2.1 mtDNA Mutationen | 4 |
| 1.3 Atmungskette - Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) | 5 |
| 1.3.1 Komplex I - NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase | 7 |
| 1.3.2 Komplex IV - Cytochrom-c-Oxidase | 9 |
| 1.3.3 Superkomplexstruktur | 10 |
| 1.4 Mitochondriales Netzwerk | 11 |
| 1.5 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies | 13 |
| 1.5.1 Antioxidative Verteidigung | 14 |
| 1.5.1.1 Enzymatisch wirkende Antioxidantien | 15 |
| 1.5.2 Entkoppler der Atmungskette | 17 |
| 1.6 Metabolisches Syndrom | 18 |
| 1.6.1 Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und einer Insulinresistenz | 19 |
| 1.6.2 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung | 20 |
| 1.7 Conplastische Mäusstämme | 21 |
| 1.7.1 Forschung am conplastischen Mausmodell | 22 |
| 1.7.2 C57BL/6NTac-mt ^{AKR/J} -Kontrollstamm | 24 |
| 1.7.3 C57BL/6NTac-mt ^{BPL/1J} -Mausstamm | 24 |
| 1.8 Zielsetzung | 26 |
| 2 Methoden | 28 |
| 2.1 Experimentelle Methoden | 28 |
| 2.1.1 Haltung der Versuchsmäuse | 28 |
| 2.1.2 Bestimmung des Körpergewichts der Maus | 28 |
| 2.1.3 Bestimmung der Blutglukosekonzentration | 29 |
| 2.1.4 Blutentnahme im Longitudinalversuch | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.5 | Bestimmung des Nüchtern-Seruminsulins | 29 |
| 2.1.6 | Organentnahme aus der Maus | 30 |
| 2.1.7 | Bestimmung der submaximalen Laufleistung von Mäusen..... | 30 |
| 2.1.8 | Erfassung metabolischer und respiratorischer Parameter | 31 |
| 2.1.9 | Analyse der ROS-Akkumulation in der Leber | 31 |
| 2.1.10 | Isolation von Hepatozyten | 33 |
| 2.1.10.1 | Färben und Zählen der Hepatozyten..... | 33 |
| 2.1.11 | RNA-Isolation aus Lebergewebe..... | 34 |
| 2.1.12 | DNA-Isolation aus Lebergewebe | 35 |
| 2.1.13 | Photometrische RNA- und DNA-Konzentrationsbestimmung | 35 |
| 2.1.14 | Reverse Transkription: cDNA-Synthese | 36 |
| 2.1.15 | Real-Time TaqMan® PCR Analyse | 37 |
| 2.1.16 | Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl | 39 |
| 2.1.17 | ATP- und ADP-Messung in Hepatozyten | 40 |
| 2.1.18 | Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der BCA-Methode..... | 41 |
| 2.1.19 | Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur in Lebergewebe | 41 |
| 2.1.20 | Triglyceridbestimmungen..... | 42 |
| 2.1.20.1 | Triglyceridbestimmungen im Serum | 42 |
| 2.1.20.2 | Triglyceridbestimmung in der Leber | 43 |
| 2.1.20.3 | Leber-Triglyceride: Nachweis mittels Oil Red O..... | 44 |
| 2.1.21 | Proteinisolation aus Lebergewebe | 44 |
| 2.1.22 | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford | 45 |
| 2.1.23 | Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot | 46 |
| 2.1.23.1 | SDS-Gelelektrophorese | 46 |
| 2.1.23.2 | Western Blot: Semi-Dry-Verfahren..... | 46 |
| 2.1.23.3 | Proteindetektion mittels Immunhistochemie | 47 |
| 2.1.24 | Statistische Auswertung | 48 |
| 3 | Ergebnisse..... | 49 |
| 3.1 | Körpergewicht | 49 |
| 3.2 | Organgewichte..... | 50 |
| 3.2.1 | Lebergewicht | 50 |
| 3.2.2 | Fettgewicht | 52 |
| 3.2.3 | Muskelgewicht..... | 54 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3 | Blutglukosekonzentration | 56 |
| 3.4 | Stoffwechselfmessungen von Kontroll- und mtBPL-Mäusen | 56 |
| 3.4.1 | Aktivität, Futter-, Wasser- und Kalorienverbrauch | 57 |
| 3.4.2 | Respiratorischer Quotient | 58 |
| 3.4.3 | Genexpression ausgewählter Stoffwechselenzyme | 59 |
| 3.4.3.1 | Genexpression der Glucokinase | 59 |
| 3.4.3.2 | Genexpression der Pyruvatcarboxylase | 60 |
| 3.4.3.3 | Genexpression der Fettsäuresynthase | 60 |
| 3.4.3.4 | Genexpression des Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 | 61 |
| 3.4.3.5 | Genexpression der Carnitin-Palmityltransferase 1 α | 62 |
| 3.5 | Fetteinlagerungen im Lebergewebe..... | 63 |
| 3.5.1 | Triglyceridgehalt in der Leber..... | 65 |
| 3.5.2 | Triglyceridgehalt im Serum..... | 65 |
| 3.6 | ATP- und ADP-Gehalt in Hepatozyten | 66 |
| 3.7 | Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber..... | 67 |
| 3.8 | Expression antioxidativer Enzyme | 68 |
| 3.8.1 | Genexpression antioxidativer Enzyme in der Leber..... | 69 |
| 3.8.2 | Proteinexpression von SOD2 und Katalase in der Leber | 71 |
| 3.9 | mtDNA-Kopienzahl und mitochondrialer Transkriptionsfaktor A in der Leber..... | 72 |
| 3.10 | Genexpression von Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette..... | 73 |
| 3.11 | Genexpression von Untereinheiten des Komplex IV der Atmungskette..... | 75 |
| 3.12 | Mitochondriale Dynamik - Fusion und Teilung | 77 |
| 3.12.1 | Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine | 77 |
| 3.12.2 | Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine in der Leber | 78 |
| 3.12.3 | Proteinexpression des Teilungsproteins FIS1 | 80 |
| 3.12.4 | Verhältnis von Fusions- und Teilungsproteinen..... | 81 |
| 3.13 | Mitochondriales Netzwerk | 82 |
| 3.14 | Laufleistung | 84 |
| 4 | Diskussion..... | 85 |
| 4.1 | Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die mitochondriale ROS-Produktion und der antioxidativen Abwehr..... | 86 |
| 4.2 | Einfluss der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die OXPHOS-Kapazität..... | 88 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3 | ND5- und COX3-Genpolymorphismen bewirken eine verminderte mitochondriale Teilung | 89 |
| 4.4 | ND5- und COX3- Genpolymorphismen beeinflussen die mitochondriale Transkription..... | 90 |
| 4.5 | Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf den Kohlenhydratstoffwechsel | 92 |
| 4.6 | Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf den Fettstoffwechsel | 94 |
| 4.7 | Einfluss der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die submaximale Ausdauer | 96 |
| 5 | Zusammenfassung | 97 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 99 |
| 7 | Anhang..... | 109 |
| 7.1 | Gebrauchsfertige Lösungen und Puffer | 109 |
| 7.2 | Angesetzte Lösungen und Puffer | 109 |
| 7.3 | Verwendete Chemikalien | 111 |
| 7.4 | Verwendete Antikörper | 112 |
| 7.5 | Verwendete Genexpressionssonden | 113 |
| 7.6 | Verwendete Kits | 114 |
| 7.7 | Verbrauchsmaterialien..... | 114 |
| 7.8 | Geräte..... | 115 |
| 7.9 | Software..... | 116 |
| | Eigenständigkeitserklärung..... | 117 |
| | Danksagung..... | 119 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau eines Mitochondriums schematisch dargestellt..... | 1 |
| Abbildung 2: Mitochondriale Gene – modifiziert nach Lehninger Biochemie..... | 3 |
| Abbildung 3: Komplexe der oxidativen Phosphorylierung..... | 6 |
| Abbildung 4: Gekoppelter Transfer von Elektronen und Protonen durch die NADH:Q-Oxidoreduktase.... | 8 |
| Abbildung 5: Mechanismus der Cytochrom-c-Oxidase Reaktion nach Stryer (2018)..... | 10 |
| Abbildung 6: Struktur eines Superkomplexmodells..... | 11 |
| Abbildung 7: An der mitochondrialen Dynamik eines Mitochondriums beteiligten Proteine..... | 12 |
| Abbildung 8: Katalytischer Zyklus der Glutathion-Peroxidase. | 16 |
| Abbildung 9: Kreuzungsschema zur Generierung eines conplastischen Mausstammes am Beispiel des C57BL/6NTac-mt ^{BPL/1J} -Stammes..... | 22 |
| Abbildung 10: Punktmutationen des mtBPL-Mausstammes..... | 25 |
| Abbildung 11: Oxidation von MitoSOX durch Superoxidanionen..... | 32 |
| Abbildung 12: Zählquadrat einer Neubauerzählkammer..... | 34 |
| Abbildung 13: Aufbau des Semi-Dry-Blots..... | 47 |
| Abbildung 14: Körpergewicht von Kontroll- und mtBPL-Mäusen. st)..... | 49 |
| Abbildung 15: Lebergewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. | 51 |
| Abbildung 16: Fettgewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse..... | 53 |
| Abbildung 17: Muskelgewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse..... | 55 |
| Abbildung 18: Blutglukosekonzentration der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. | 56 |
| Abbildung 19: Futter- und Wasserverbrauch, Aktivität und Kalorienverbrauch im Tagesdurchschnitt. | 57 |
| Abbildung 20: Respiratorischer Quotient..... | 58 |
| Abbildung 21: Genexpressionsmuster der Glucokinase in der Leber. | 59 |
| Abbildung 22: Genexpressionsmuster der Pyruvatcarboxylase in der Leber..... | 60 |
| Abbildung 23: Genexpressionsmuster der Fettsäuresynthase in der Leber..... | 61 |
| Abbildung 24: Genexpressionsmuster der Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 in der Leber..... | 62 |
| Abbildung 25: Genexpressionsmuster der Carnitin-Palmityltransferase 1 α in der Leber..... | 63 |
| Abbildung 26: Fetteinlagerungen im Lebergewebe.. | 64 |
| Abbildung 27: Triglyceridgehalt in der Leber..... | 65 |
| Abbildung 28: Triglyceridgehalt im Serum. | 66 |
| Abbildung 29: ATP- und ADP-Gehalt in isolierten Hepatozyten.)..... | 67 |
| Abbildung 30: Analyse reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber. | 68 |
| Abbildung 31: Altersabhängige Genexpressionsmuster antioxidativer Enzyme in der Leber..... | 70 |
| Abbildung 32: Altersabhängige Proteinexpression von Katalase und SOD2 in der Leber. | 71 |
| Abbildung 33: Die mtDNA Kopienzahl und die relative TFAM Genexpressionsrate in der Leber.)..... | 72 |
| Abbildung 34: Altersabhängige Genexpressionsmuster von Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette in der Leber.)..... | 74 |
| Abbildung 35: Altersabhängige Genexpression von Untereinheiten des Komplex IV der Atmungskette in der Leber..... | 76 |
| Abbildung 36: Genexpressionsanalyse mitochondrialer Fusionsproteine im Lebergewebe..... | 78 |
| Abbildung 37: Genexpressionsanalyse mitochondrialer Teilungsproteine im Lebergewebe. | 79 |
| Abbildung 38: Altersabhängige Proteinexpression von FIS 1 in der Leber..... | 80 |
| Abbildung 39: Verhältnis der Genexpressionsraten mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine in der Leber..... | 81 |
| Abbildung 40: Analyse des mitochondrialen Netzwerks im Lebergewebe.)..... | 83 |
| Abbildung 41: Submaximale Laufleistung von Kontroll- und mtBPL-Mäusen. | 84 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| A. dest | Aqua dest – destiliertes Wasser |
| ACADL | Acyl-CoA Dehydrogenase Long Chain |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ASCVD | atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen |
| ASH | alkoholische Fettlebererkrankung |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BMI | Body-Mass-Index |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CAT | Katalase |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CI - CV | Komplex I - V |
| CoQ | Coenzym Ubichinon |
| COX1-3, 5a, 6a1, 6b1, 7a2 | Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1-3, 5a, 6a1, 6b1, 7a2 |
| CPT1a | Carnitine-Palmitoyltransferase 1a |
| Cu ²⁺ | Kupfer-Ion |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNM1L | Dynamamin-1-like Protein |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| EASD | European Association for the Study of Diabetes |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid, |
| FAM | 6-Carboxyfluorescein |
| FASN | Fettsäure-Synthase |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FELASA | Federation for Laboratory Animal Science Associations |
| FIS1 | Fission 1 Protein |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| g/l | Gramm pro Liter |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| Gbp | Giga-Basenpaare |
| GCK | Glucokinase |
| GPx | Glutathion-Peroxidase |
| GSH | Glutathions |
| GSSG | Glutathion-Disulfid |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HDL | High-Density-Lipoprotein |

| | |
|---------------------------------|---|
| Hepes | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IE | Internationale Einheit |
| IMR | Intermembranraum |
| IR | Insulinresistenz |
| Kbp | Kilo-Basenpaare |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| LOHN | Lebersche hereditäre Optikus-Neuropathie |
| LS | Leigh Syndrom |
| M | Mol |
| MAM | mitochondriale Außenmembran |
| MELAS | Mitochondriale Encephalomyopathie, Lactatacidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden |
| MetS | metabolisches Syndrom |
| MFF | mitochondrialer Fission-Faktor |
| MFN1/2 | Mitofusin 1 und 2 |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| MIM | mitochondriale Innenmembran |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| mM/l | Millimol pro Liter |
| mRNA | messenger-Ribonucleinsäure |
| MS | Multiplen Sklerose |
| mtDNA | mitochondriale Desoxyribonukleinsäure |
| MTDR | MitoTracker® Deep Red |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NAFLD | nonalcoholic fatty liver disease – nicht-alkoholische Fettleber |
| NaHCO | Natriumhydrogencarbonat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NASH | nichtalkoholische Steatohepatitis - |
| ND 1-6, 4L | NADH Dehydrogenase Untereinheit 1-6, 4L |
| nDNA | nukleäre Desoxyribonukleinsäure |
| NDUFA 11 | NADH Dehydrogenase Ubiquinon 1 Alpha Subkomplex 11 |
| NDUFB 4, 8 | NADH Dehydrogenase Ubiquinon 1 Beta Subkomplex 4 und 8 |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | molekularer Sauerstoff |
| O ₂ ^{·-} | Superoxidanion |
| OD | optische Dichte |
| OH | Hydroxid |
| OPA1 | Optic Atrophy 1 Protein |
| OXPHOS | Oxidative Phosphorylierung |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCX | Pyruvatdecarboxylase |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| P _i | anorganisches Phosphat |
| PK | Pyruvatkinase |
| PRDX3 | Peroxiredoxin 3 |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |

| | |
|-------------|--|
| Q | Ubichinon |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RO | Alkoxyradikal |
| ROO | Peroxyradikal |
| ROOH | Hydroperoxid |
| ROS | reaktiven Sauerstoffspezies |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| rtPCR | Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| RT-qPCR | quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion |
| SCAF 1 | Superkomplex-Assemblierungs Faktor(fehlt) |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfat |
| SeH | Selenolat |
| SEM | standard error of the mean - Standardfehler |
| SeOH | Selensäure |
| SeSG | Selensulfidaddukt |
| SOD1/2 | Superoxiddismutase |
| SREBF 1 | Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1 |
| T2DM | Type-2-Diabetes mellitus |
| TFAM | Transkriptionsfaktor A |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| Trx | Thioredoxin |
| U/min (rpm) | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute) |
| UCP1-3 | Uncoupling Protein - entkoppelndes Proteine 1-3 |
| WHO | World Health Organization - Weltgesundheitsorganisation |

1. Einleitung

1.1 Das Mitochondrium

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer doppelten Membran und einem eigenen, ringförmigen Genom, welches mehrfach in einem Mitochondrium vorliegt. Mitochondrien kommen in fast allen eukaryotischen Zellen vor [1]. Sie sind verantwortlich für den Hauptanteil der Adenosintriphosphat (ATP) -Synthese und werden deshalb auch als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. Je nach Energiebedarf der Zelle ist ihre Anzahl sehr unterschiedlich. Beispielsweise befinden sich in einer Rattenleberzelle 1000-2000 dieser Organellen, was 20-25 % des Zellvolumens ausmacht [2]. Abhängig von der Funktion einer Zelle ordnen sich die Mitochondrien in der Zelle und sammeln sich in der Nähe von Zellbereichen mit hohem ATP-Verbrauch an [3].

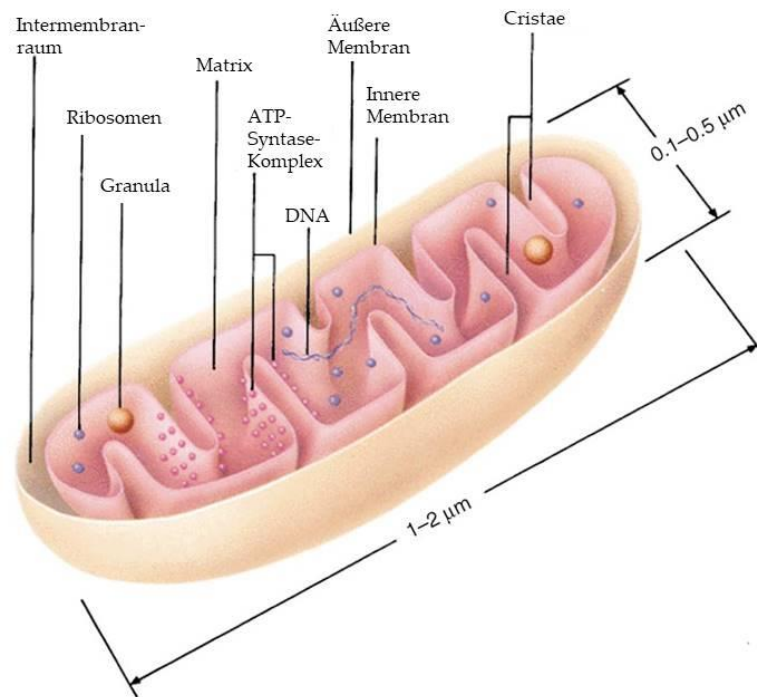


Abbildung 1: Aufbau eines Mitochondriums schematisch dargestellt [4]

Die Größe vieler Mitochondrien entspricht mit einer Durchschnittslänge von 1-2 µm und einer Durchschnittsbreite von circa 0,1-0,5 µm in etwa der von Bakterien. Allerdings weisen Mitochondrien eine gewisse Plastizität auf, variieren stark in ihrer Form und können komplexe

Netzwerke unterschiedlicher Struktur bilden [4]. Mitochondrien bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, wobei diese sich in Aufbau und Funktion unterscheiden. Zwischen den Membranen befindet sich der Intermembranraum, welcher als eigenständiges Kompartiment angesehen wird. Die Innenmembran bildet Einstülpungen in die Matrix, die sogenannten Cristae, wodurch die Oberfläche der Membran vergrößert wird (Abbildung 1) [4]. Die innere und äußere Membran unterscheiden sich in ihrer Durchlässigkeit. Während die äußere Membran durch integrierte Porine permeabel für kleinere Moleküle und Ionen ist, ist die innere Membran nahezu undurchlässig [1, 5]. Die einzige Möglichkeit für Ionen und kleinere Moleküle, die innere Membran zu durchqueren, sind spezielle Transportsysteme. In der inneren Membran (MIM) befindet sich auch das Elektronentransportsystem der Atmungskette, welches aus fünf Proteinkomplexen (CI - CV) besteht und wodurch die zelluläre Energiegewinnung über die ATP-Synthase ermöglicht wird. Die innere Membran eines Mitochondriums enthält eine Vielzahl solcher Atmungskettenkomplexe sowie ATP-Synthase-Moleküle [1]. Viele oxidative Stoffwechselwege, die die Substrate zur Energiegewinnung liefern, werden durch in der Matrix lokalisierte Enzyme wie die des Citratzyklus, der β -Oxidation und des Aminosäureabbaus realisiert [1]. Neben dieser zentralen Rolle der Energiegewinnung sind Mitochondrien ebenso an Prozessen wie der Apoptose und der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt und tragen zur Calciumspeicherung bei [6].

1.2 Mitochondriale DNA

Die Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, eine ringförmige Doppelstrang-DNA (mtDNA), die wesentlich kleiner ist als die nukleäre DNA (nDNA) im Zellkern. Jedes Mitochondrium enthält ungefähr zwei bis zehn solcher Genomexemplare [1]. Somit befinden sich abhängig vom zellulären Energieverbrauch in jeder Zelle mehrere Tausend mtDNAs. Säugetierzellen enthalten 100 bis 10000 mtDNAs [7]. Beim Menschen umfasst die mtDNA etwa 16,569 kbp während die nDNA aus 3,07 Gbp besteht [1, 8, 9]. Insgesamt wurden 90 [10] bzw. 92 [11] Gene identifiziert, die für die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe kodieren. Das mitochondriale Genom des Menschen (Abbildung 2) kodiert für 11 Messenger-RNAs (mRNAs), zwei ribosomale RNAs (12S und 16S rRNAs) und 22 Transfer-RNAs (tRNAs) [1, 9, 10, 12, 13]. Die Gene der Komplexuntereinheiten der Atmungskette werden sowohl auf der nukleären als auch auf der mitochondrialen DNA kodiert [11]. Die 11 kodierten mRNAs auf der mtDNA werden in 13 Protein-Untereinheiten der

Atmungskette umgeschrieben, welche essentiell für die Funktion der oxidativen Phosphorylierung sind [10].

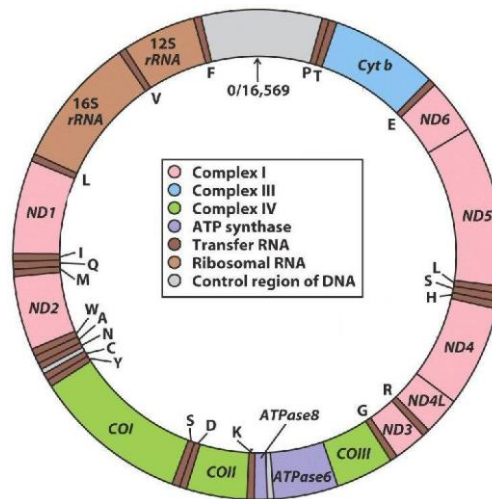


Abbildung 2: Mitochondriale Gene – modifiziert nach Lehninger Biochemie [1]. In dieser mtDNA-Karte werden die Positionen der Gene für folgende Proteine gezeigt: Untereinheiten des Komplexes I (ND1-ND6 und ND4L) und des Komplexes IV (COI-COIII), 2 Untereinheiten der ATP-Synthase (ATPase6 und ATPase8). Ebenso sind die Gene für ribosomale RNA-Moleküle und mehrere Gene für mitochondrienspezifische tRNAs dargestellt. Die Spezifität der tRNA-Moleküle ist durch den Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren gekennzeichnet.

Die überwiegende Mehrheit der Mitochondrienproteine wird vom nukleären Genom kodiert, an den Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert und anschließend posttranslational über eine Signalsequenz in den Intermembranraum oder in die Matrix transportiert. Die importierten Proteine sind auch für die Replikation und Transkription der mtDNA sowie der mitochondrialen Translation verantwortlich [10-12]. Die Replikation des mitochondrialen Genoms verläuft unabhängig vom Zellzyklus und von der Regulation der nukleären Replikation [14]. Ein wichtiger regulatorischer Faktor zwischen mitochondrialer Transkription und Replikation ist der nukleär-kodierte mitochondriale Transkriptionsfaktor A (TFAM), welcher indirekt die Initiationsphase der Replikation stimuliert und bei der mitochondrialen Genomverdichtung sowie der Kontrolle der mtDNA-Kopienzahl mitwirkt [15-17].

Das mitochondriale Genom wird ausschließlich maternal vererbt. Mutationen im mitochondrialen Genom können alle mtDNA-Moleküle einer Zelle betreffen (Homoplasie) oder nur einen Teil, sodass mutierte und gesunde mtDNA-Moleküle gleichzeitig vorliegen können (Heteroplasie) [18].

1.2.1 mtDNA Mutationen

Seit den frühen 1990er Jahre nahmen Studien zur Untersuchung mitochondrialer Erkrankungen zu. Diese Erkrankungen treten häufiger auf als ursprünglich angenommen [19, 20]. Aufgrund der Vielzahl von Mitochondrien pro Zelle mit unterschiedlicher Anzahl an mtDNAs kann der Grad der Heteroplasie unterschiedlich sein [21]. Das Verhältnis zwischen mutierter und gesunder mtDNA in einer Zelle ist ausschlaggebend für die Pathogenese einer Erkrankung („threshold effect“) [22]. Erst vor kurzem konnte in einer Studie am Mausmodell die bedeutende Rolle einer geringen mtDNA-Heteroplasie für den Metabolismus und die Lebensdauer von Mäusen gezeigt werden [23]. Erkrankungen, die durch mitochondriale Defekte entstehen, werden als primär-mitochondriale Erkrankung bezeichnet [11, 24]. Sie können sowohl durch Mutationen in der mtDNA als auch durch Mutationen in der nukleären DNA hervorgerufen werden und können in jedem Organ des menschlichen Körpers zu jedem Zeitpunkt des Lebens auftreten. In Geweben mit einem hohen Energiebedarf wie Herz, Muskel, Niere, Leber oder im endokrinen System zeigen sich klinische Symptome von mitochondrialen Erkrankungen besonders deutlich [9]. Mitochondriale Dysfunktionen, die meist mit einer Fehlfunktion der Atmungskette einhergehen, können die Ursache für chronische Erkrankungen sowie für die Pathogenese von Karzinomen sein [9, 25]. Weitere Dysfunktionen der Atmungskette, welche durch Mutationen in Struktur- oder Aufbauenen sowie in Genen zur Aufrechterhaltung, Replikation, Transkription und Translation der mtDNA hervorgerufen werden können, sind mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem LS (Leigh-Syndrom) [11, 26], dem MELAS-Syndrom (Mitochondriale Enzephalomyopathie, Lactatacidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden) [27] oder der MS (Multiple Sklerose) [28] assoziiert. Ebenso werden Krankheitsbilder wie das LHON-Syndrom (Lebersche hereditäre Optikus-Neuropathie) [29], T2DM (Type-2-Diabetes mellitus) [30] oder auch Myopathien [26] mit mtDNA-Polymorphismen in Zusammenhang gebracht. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass besonders Mutationen in den ND-Untereinheiten des Komplex I eine wichtige Rolle bei OXPHOS-Erkrankungen spielen [26, 31-33].

In Tabelle 1 sind Punktmutationen in Genen, welche Untereinheiten von Komplex I und Komplex IV der Atmungskette betreffen, mit ihren assoziierten Krankheitsbildern zusammengefasst.

| Mutation | Gen | Krankheitsbild | Referenz |
|--|------------|--------------------------------|-----------------|
| m.3460 D>A | ND1 | LHON | [26] |
| m.10158 T>C, m.10191 T>C, m.10197 G>A | ND3 | LS, Leigh-like Syndrom | [26] |
| m.11777 C>A | ND4 | LS | [26] |
| m.11778 G>A | ND4 | LHON | [26] |
| m.13513 G>A und viele weitere Mutationen | ND5 | MELAS, LS und Overlap-Syndrom | [26, 32, 33] |
| m.11484 T>C | ND6 | LHON | [26, 31] |
| m.14709 T>C | ND6 | Myopathie, Müdigkeit, Diabetes | [26] |
| m.14459 G>A, m.14487 T>C | ND6 | LS | [26] |
| m.9276 G>C | COX3 | Diabetes, Taubheit | [34] |
| m.5913 G>A | COX1 | Bluthochdruck | [34] |

Tabelle 1: Übersicht von Polymorphismen in Untereinheiten der Komplexe I und IV der Atmungskette und assoziierte Krankheiten.

1.3 Atmungskette - Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)

Die Atmungskette besteht aus vier Komplexen: drei Protonenpumpen und einer direkten Verbindung zum Citratzyklus [35]. Stoffwechselwege, die im Zytosol stattfinden, werden durch die stark selektiv durchlässige innere Membran von den Stoffwechselvorgängen, die in der Matrix ablaufen, getrennt. Pyruvat, Fettsäuren und Aminosäuren gelangen über spezielle Transporter in die Matrix, um im Citratzyklus beziehungsweise in der β -Oxidation weitere katabole Prozesse zu durchlaufen. Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphatmoleküle (P_i) werden ebenfalls über spezielle Transporter in die Matrix befördert, während synthetisiertes ATP aus dem Mitochondrium heraus transportiert wird [1]. Produkte des Citratzyklus, der β -Oxidation und der Glykolyse, wie NADH und $FADH_2$ oder auch Succinat werden als Elektronendonatoren von den Metalloprotein-Komplexen der Elektronentransportkette genutzt, um Protonen durch die innere Membran in den Intermembranraum zu pumpen [11]. Zur Elektronentransportkette, auch Atmungskette genannt, gehören vier Proteinkomplexe, welche in der inneren Membran des Mitochondriums verankert sind. Dies ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Heute geht man davon aus, dass die Atmungskettenkomplexe in Form einer Superkomplexstruktur angeordnet sind (1.3.3).

Der Elektronentransport über die Komplexe der Atmungskette ermöglicht die Protonentranslokation aus der Matrix in den Intermembranraum, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird [36]. Das so entstandene elektrochemische Potential ($\Delta\mu\text{H}^+$) wird von der ATP-Synthase genutzt, welche schließlich durch „Rotationskatalyse“ die Energieform ATP synthetisiert.

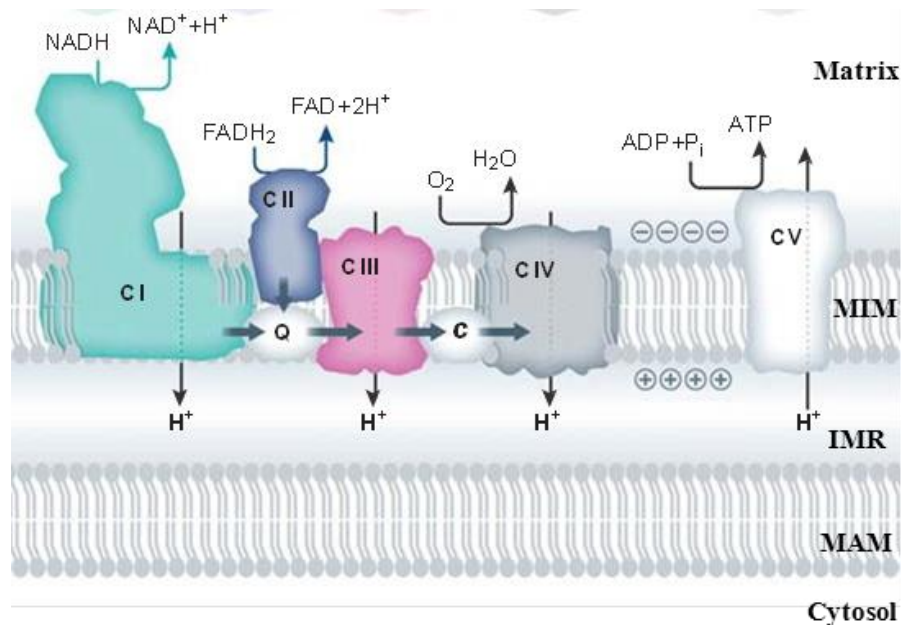


Abbildung 3: Komplexe der oxidativen Phosphorylierung – modifiziert nach Koopman [11]. Das mitochondriale OXPHOS-System (Atmungskette) besteht aus fünf Komplexen (I-V), die in der mitochondrialen inneren Membran (MIM) intergriert sind. Die MIM befindet sich zwischen Matrix und Intermembranraum (IMR). Diese ist vom Zytosol durch die mitochondriale Außenmembran (MAM) abgetrennt.

Der Haupteinstieg in die Atmungskette erfolgt mit der Elektronenübertragung von dem Reduktionsäquivalent NADH auf Komplex I, der NADH-Dehydrogenase [1]. Der Komplex I befördert die freigesetzten Elektronen auf Ubichinon (Coenzym Q), welches zu Ubichinol reduziert wird, und pumpt gleichzeitig vier Protonen in den Intermembranraum [37, 38] (1.3.1). Komplex II, die Succinat-Dehydrogenase, ist sowohl ein Teil der Atmungskette als auch das einzige membrangebundene Enzym im Citratzyklus und oxidiert FADH_2 zu Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Im Gegensatz zum Komplex I werden vom Komplex II keine Protonen transportiert, sondern nur die freigesetzten Elektronen auf das Coenzym Q übertragen [37]. Die Elektronen werden vom Ubichinol weiter auf den Komplex III, der Cytochrom-c-Oxidoreduktase, transferiert. Vom Komplex III werden die Elektronen auf einen „Ein-Elektronen-Carrier“, dem

Cytochrom c, mit gleichzeitigem Protonentransport in den IMR übertragen. Mit Hilfe einer weiteren Protonenpumpe der Atmungskette, dem Komplex IV oder der Cytochrom-c-Oxidase, werden die Elektronen vom Cytochrom c auf den Endakzeptor, dem molekularen Sauerstoff, übertragen. Der reduzierte Sauerstoff reagiert schrittweise mit Protonen aus der Matrix zu Wasser, welches anschließend freigesetzt wird (1.3.2). Durch den Protonentransport in den Intermembranraum entsteht ein Protonengradient, der von der ATP-Synthase, auch Komplex V genannt, genutzt wird, um einen kontrollierten Rückfluss der Protonen zu ermöglichen. Die dabei freigesetzte Energie wird in der Reaktion von ADP und P_i zu ATP konserviert [1, 35, 37].

1.3.1 Komplex I - NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase

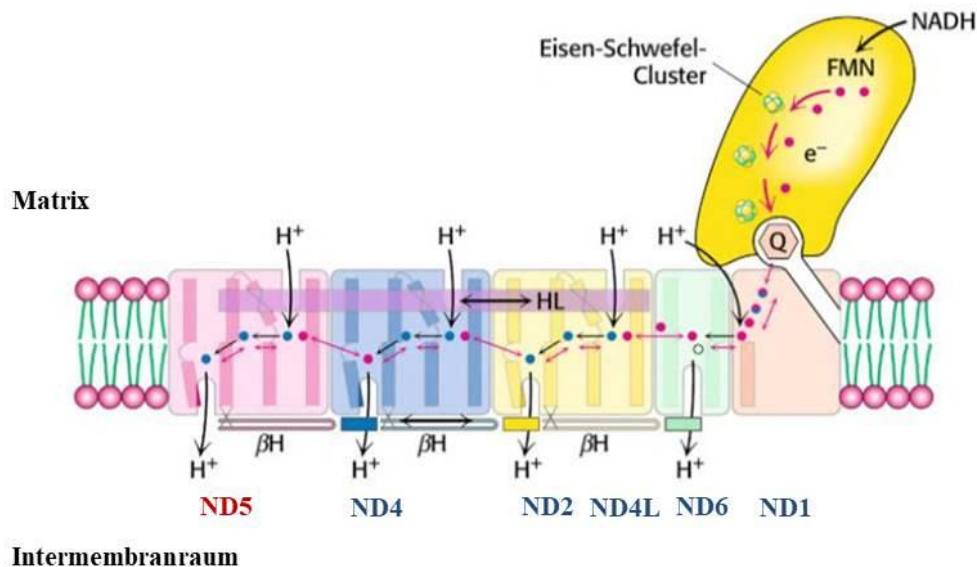
Der Komplex I ist der erste und größte Enzymkomplex in der Atmungskette. Die bei der Oxidation von $NADH/H^+$ frei werdenden Elektronen werden über den Komplex I (auch als NADH-Dehydrogenase oder NADH: Ubichinon(Q)-Oxidoreduktase bezeichnet) in die Atmungskette eingeschleust [35]. Der Komplex I ist eine rund 980 kDa große Protonenpumpe, die aus 45 Untereinheiten besteht und L-förmig in die MIM eingebaut ist [11, 38, 39]. Ein Arm des L-förmigen Komplexes liegt in der inneren Mitochondrienmembran und der andere ragt senkrecht in die Matrix (Abbildung 4). Der Komplex I enthält 14 hochkonservierte Untereinheiten, die das aktive Zentrum bilden, welches hauptsächlich für den Elektronentransfer verantwortlich ist [39]. Sieben dieser Untereinheiten sind hydrophob und können daher in der Membran lokalisiert werden. Diese Untereinheiten werden von Genen der mitochondrialen DNA kodiert. Zu diesen sieben Untereinheiten gehören ND1, ND2, ND3, ND6 und ND4L im proximalen Teil sowie ND4 und ND5 im distalen Teil des membranständigen Arms, welche die Protonenkanäle ausbilden (Abbildung 4) [11]. Zur Untereinheit ND5 gehört eine querliegende Helix, welche den hydrophoben mit dem hydrophilen Arm verbindet [38]. Der ND4- und ND6-Untereinheit wird eine essentielle Rolle beim Aufbau und der Stabilisierung von Komplex I zugesprochen, während die ND5-Untereinheit neben der Aufbaufunktion eine wesentliche Rolle für die Aktivität des Komplexes spielt [40]. Die restlichen sieben hochkonservierten Untereinheiten sind hydrophil und werden von nukleären Genen kodiert [35]. Dies gilt auch für die übrigen 31 Untereinheiten, deren Funktion bis heute ungeklärt ist [37]. Der hydrophile Arm des Komplex I enthält außerdem alle prosthetischen Gruppen, die für die Redoxreaktionen (NADH Oxidation und Ubichinon (Q)

Reduktion) notwendig sind [38]. Hierzu gehören ein nicht-kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) und neun Eisen-Schwefel-Cluster [39].

Durch Bindung des NADH/H^+ und Übertragung zweier Elektronen auf das FMN entsteht die reduzierte Form FMNH_2 . Über eine Reihe von Eisen-Schwefel-Cluster werden die Elektronen zum Ubichinon weitertransportiert und es entsteht Ubichinol. Diese negative Ladung des Ubichinols tritt in Wechselwirkung mit negativ geladenen Aminosäureresten im membranständigen Komplexabschnitt und bewirkt Konformationsänderungen der vier Protonenhalbkanaäle, wodurch sich Protonen aus der Matrix zunächst an Aminosäuren im membranständigen Komplexabschnitt binden. Die Protonen werden anschließend in die mit Wassermolekülen ausgekleideten Kanäle abgegeben und gelangen so in den Intermembranraum (Abbildung 4) [35, 37, 38]. Somit ergibt sich die folgende katalytische Reaktion des Komplexes I:



Das Ubichinon nimmt damit zwei Protonen aus der Matrix auf, sodass QH_2 entsteht, welche bei der Wiederabgabe an Komplex III ebenfalls zum Aufbau des Protonengradienten beitragen [35].



nach Baradaran R et al. (2013), aus Stryer Biochemie (2018)

Abbildung 4: Gekoppelter Transfer von Elektronen und Protonen durch die NADH:Q-Oxidoreduktase [35]. Der Fluss von zwei Elektronen im Komplex I von NADH über FMN und Eisen-Schwefel-Cluster zum Ubichinon durch die NADH: Q-Oxidoreduktase führt dazu, dass vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum herausgepumpt werden und so zur Entstehung einer protonenmotorischen Kraft beitragen. HL: horizontale Helix; βH: β-Haarnadel-Helix; Q: Ubichinon

1.3.2 Komplex IV - Cytochrom-c-Oxidase

Der Komplex IV, die Cytochrom-c-Oxidase oder auch als Cytochrom-c:O₂-Oxidoreduktase bezeichnet, ist das letzte Enzym im Ablauf der Elektronentransportkette und reduziert Sauerstoff zu Wassermoleküle mit Hilfe der durch die Atmungskettenkomplexe transportierten Elektronen [35, 37, 41]. In der Summe werden durch die Komplexe I, III und IV 5 Protonen pro Elektron aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt, wobei ein Protonengradient und ein elektrochemisches Potential über der inneren Mitochondrienmembran entsteht [37]. Der Komplex IV ist fest in der inneren Mitochondrienmembran verankert und besteht aus 14 Untereinheiten [42, 43], von denen die drei größten Untereinheiten COX1, COX2 und COX3 vom mitochondrialen Genom kodiert werden und den katalytischen Kern des Enzyms formen [41]. Die anderen Untereinheiten sind nukleär-kodiert und spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau und der Regulation des Enzyms [44]. Die Cytochrom-c-Oxidase besitzt zwei Häm-A-Gruppen und zwei Kupferzentren mit drei Kupferionen. Das Elektron vom Cytochrom c, welches als ein Elektronen-Carrier fungiert, wird in der Cytochrom-c-Oxidase zunächst an die Kofaktoren Cu_A/Cu_A und Häm α der COX2-Untereinheit gebunden (Abbildung 5-1), um anschließend im binukleären Zentrum (BNZ) Häm α_3 und Cu_B zu reduzieren (Abbildung 5-2) [35, 41]. Das BNZ bildet das aktive Zentrum in der Cytochrom-c-Oxidase und befindet sich in der Untereinheit COX1 [45]. Molekularer Sauerstoff (O₂) wird nun an die reduzierten prosthetischen Gruppen im BNZ gebunden. Indem der O₂ jeweils ein Elektron von Häm α_3 und Cu_B an sich bindet, entsteht zwischen dem Eisen des Häm α_3 und dem Cu_B eine Peroxid-(O₂²⁻) Brücke (Abbildung 5-3). Durch Bindung zwei weiterer Cytochrom-c-Moleküle wandern zwei Elektronen zum aktiven Zentrum und reduzieren dort mit Hilfe zweier H⁺ die sauerstoffbindenden Gruppen zu Cu_B²⁺-OH und Fe³⁺-OH (Abbildung 5-4). Die Reaktion mit zwei weiteren H⁺ führt zur Freisetzung von zwei H₂O-Molekülen und der Regeneration der Cytochrom-c-Oxidase [35]. Im Verlaufe dieser Reaktionen werden vier weitere Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Dieser bedeutende Vorgang der Protonenpumpe trägt maßgeblich zum Aufbau des Protonengradienten bei und wird durch die Untereinheit COX3 realisiert [46]. Somit ergibt sich für den Komplex IV eine katalytische Reaktion, welche wie folgt verläuft:



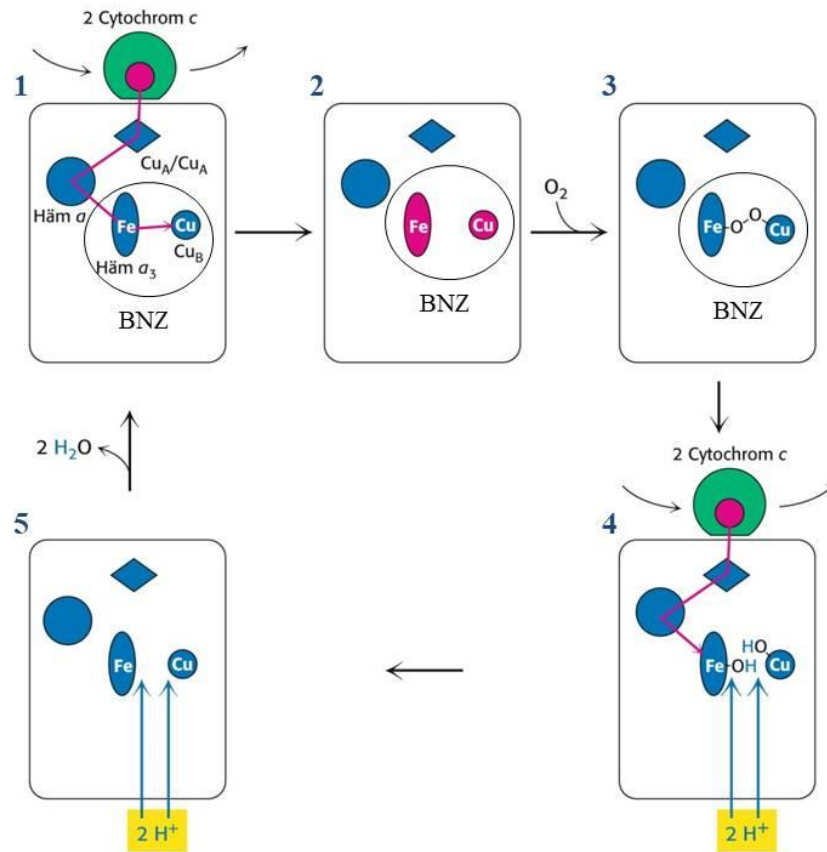


Abbildung 5: Mechanismus der Cytochrom-c-Oxidase Reaktion nach Stryer (2018). Alle blau dargestellten prosthetischen Gruppen liegen zu Beginn des Komplexzyklus in ihrer oxidierten Form vor. Die reduzierten Formen sind rot dargestellt. Vier Cytochrom-c-Moleküle geben vier Elektronen ab und ermöglichen die Translokation von vier H⁺ aus der Matrix unter Bindung und Spaltung eines O₂-Moleküls. Hierbei entstehen zwei H₂O-Moleküle. Diese werden vom Enzym freigesetzt, sodass die Cytochrom-c-Oxidase wieder in ihrem Ausgangszustand vorliegt. (einzelne Reaktionsschritte im Abschnitt 1.3.2)

1.3.3 Superkomplexstruktur

Nach derzeitigem Wissen geht man davon aus, dass die Komplexe der Atmungskette nicht zufällig oder in einer Reihe in der inneren Mitochondrienmembran angeordnet sind, sondern sich zu Superkomplexstrukturen, auch Respirasomen genannt, formieren [47]. In Säugetieren konnte in aktuellen Studien die Struktur und Bildung der Superkomplexformation C₁C₃III₂C₄IV identifiziert und beschrieben werden [47-49]. Die Mehrheit der Komplex I-Moleküle gehört zu einem Superkomplex mit einem Komplex III-Dimer und einem Komplex IV-Molekül. Zusätzlich konnten bereits auch Superkomplexe bestehend aus Komplex I und einem Komplex III-Dimer (C₁C₃III₂) sowie aus einem Komplex III-Dimer und Komplex IV (C₃III₂C₄IV) identifiziert werden [47]. In der Arbeit von Guo *et al.* wurde der zirkulär angeordnete Aufbau des Megakomplexes I₂III₂IV₂

($\text{MC}_1\text{I}_2\text{III}_2\text{IV}_2$) untersucht und die Hypothese aufgestellt, dass auch Komplex II in einem solchen Megakomplex ($\text{MC}_1\text{I}_2\text{II}_2\text{III}_2\text{IV}_2$) vorliegt (Abbildung 6) [50]. Dieser Strukturanalyse nach sind zusätzlich zwei Cytochrom c -Moleküle am Komplex III-Dimer im Intermembranraum gebunden. Zur Stabilisierung der Superkomplexe konnte der Superkomplex-Assembly Faktor SCAF 1, auch bekannt als COX7a2l, identifiziert werden [51, 52]. Dieser unterstützt die Interaktionen zwischen Komplex III und Komplex IV [51, 53].

Vermutlich bewirkt die Superkomplexbildung einen schnelleren katalytischen Effekt sowie eine effizientere Anordnung der Protonentransportkanäle, die Entstehung von reaktiver Sauerstoffspezies vermindern kann [47, 54-57].

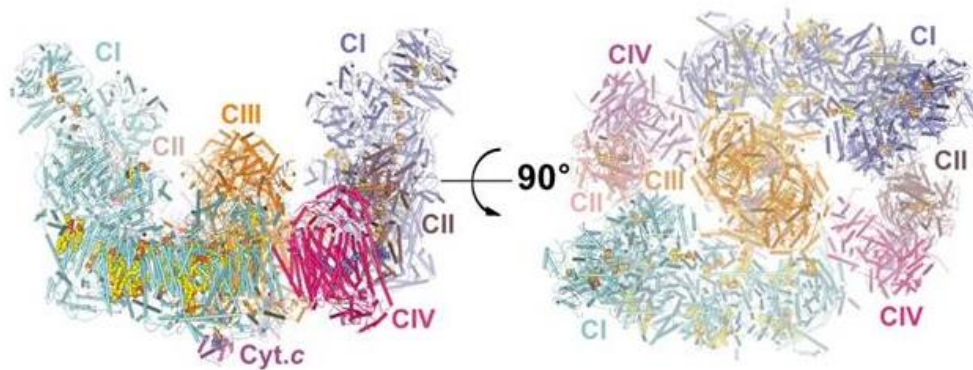


Abbildung 6: Struktur eines Superkomplexmodells – nach Guo *et al.* (2017) [50]. Das Modell eines Superkomplexes (Megakomplex $\text{I}_2\text{II}_2\text{III}_2\text{IV}_2$) in zwei verschiedenen Ansichten (links, entlang der inneren Membran; rechts, Aufsicht von der Matrixseite aus). Die Beschriftungen der Komplexe (CI-IV) und des Cytochrom c -Moleküls (Cyt.c) sind in der gleichen Farbe dargestellt wie deren Strukturformationen.

1.4 Mitochondriales Netzwerk

Die Dynamik der Mitochondrien und deren Fähigkeit, sich zu teilen, wurden bereits vor über 100 Jahren (1915) unter dem Lichtmikroskopie beobachtet [58]. Durch die spätere Entwicklung von Phasenkontrastmikroskopen und die Möglichkeit, gezielt Proteine mit fluoreszierenden Vitalfarbstoffen sichtbar zu machen, konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien sich auch in ruhenden Zellen kontinuierlich teilen und wieder miteinander verschmelzen [59-61]. Mitochondrien bilden ein eigenes dynamisches Netzwerk in der Zelle, welches durch die Prozesse der Fusion und Teilung (Fission) beeinflusst wird (Abbildung 7). Ein Ungleichgewicht in diesen Prozessen kann zu starken Veränderungen in der Morphologie der Mitochondrien führen. Möglich

ist das Verschmelzen aller Mitochondrien in der Zelle zu einem einzigen geschlossenen Netzwerk oder eine Hyperfragmentierung, bei der die Mitochondrien in unzählige kleine Organellen geteilt werden [62]. Die mitochondriale Dynamik wird unabhängig an der inneren und der äußeren Mitochondrienmembran (MAM) durch spezifische Fissions- und Fusionsproteine reguliert.

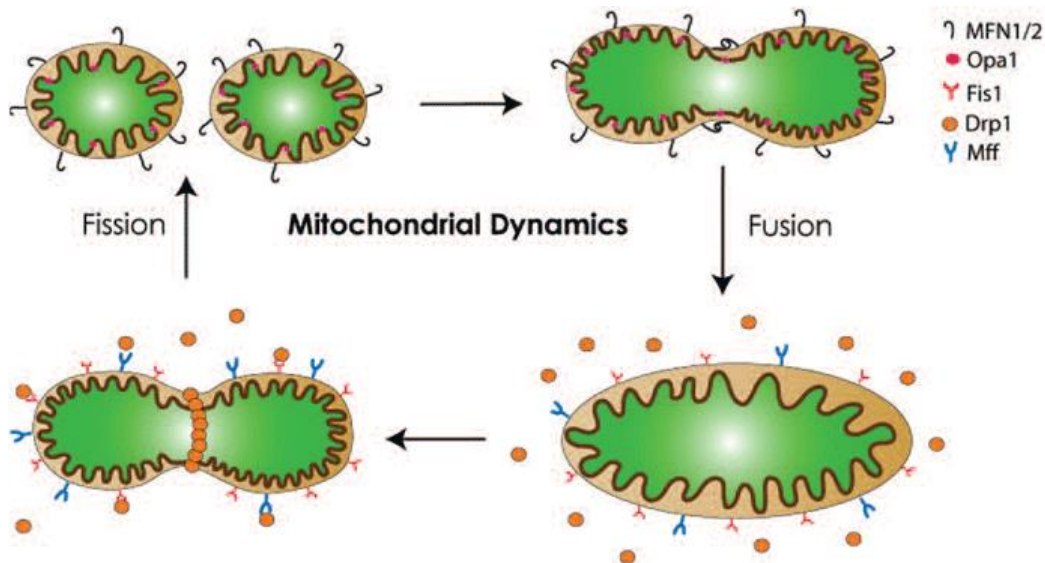


Abbildung 7: An der mitochondrialen Dynamik eines Mitochondriums beteiligten Proteine. Die mitochondrialen Teilungs- und Fusionsprozesse werden durch Fissions- und Fusionsproteine wie Mff1/2, Opa 1, Fis 1, Drp 1 und Mff reguliert [63].

An der MAM wird der Fusionsvorgang durch Mitofusin 1 und Mitofusin 2 (MFN 1/2) reguliert. MFN 1 und 2 gehören zu den monomeren G-Proteinen und können Proteinkomplexe bilden, welche die Verbindung zwischen einzelnen Mitochondrien vermittelt [63, 64]. Der Fusionsprozess wird sowohl durch MFN 1 als auch durch MFN 2 initiiert. An der IMM ist das Optic Atrophy 1 Protein (OPA 1) für die Mitochondrienfusion verantwortlich. Es gibt acht Splicevarianten des OPA 1-Proteins, die unterschiedliche Fusionsaktivitäten aufweisen [65].

Der mitochondriale Fission-Faktor (MFF) und das Fission 1-Protein (FIS1) sind an der äußeren Mitochondrienmembran verankert und aktivieren das im Zytosol vorkommende Dynamin-1-like-Protein (DNM1L, auch als Drp 1 bekannt). Dieses DNM1L-Protein bindet als Oligomer-Struktur an entsprechende Bindungsstellen auf der MAM, schnürt das Mitochondrium ab und durchtrennt dieses durch Guanosintriphosphat (GTP) -Hydrolyse [66, 67].

Durch die mitochondriale Teilung und Fusion wird ein Austausch von mitochondrialen Komponenten ermöglicht. Somit können grundlegende zelluläre Prozesse, wie die Calcium-Homöostase, die ATP-Synthese, aber auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies reguliert werden. Mitochondriales Material, welches gealtert oder funktionslos geworden ist, wird durch Mitophagie aus dem Netzwerk entfernt [68].

1.5 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Sauerstoffradikale wird eine Vielzahl von sauerstoffhaltigen und hochreaktiven Verbindungen bezeichnet. Sie spielen bei Entzündungsreaktionen und anderen pathologischen Prozessen als sogenannter „oxidativer Stress“ eine wichtige Rolle [69]. Chance *et al.* vermuteten bereits 1979, dass 1-2 % des zellulären Sauerstoffverbrauchs in Superoxidanionen im Mitochondrium umgewandelt werden [70]. Diese These wurde 2012 von Brown und Borutaite in einer Studie widerlegt, welche zeigt, dass Mitochondrien nicht die Hauptproduzenten von ROS unter physiologischen Bedingungen sind [71]. Experimente von Fridovich *et al.* zeigten, dass schätzungsweise nur 0.1 % des zellulären Sauerstoffs in Superoxidanionen umgewandelt werden und dass möglicherweise das endoplasmatische Retikulum und die Peroxisomen in der Zelle eine größere Kapazität zur Produktion von ROS besitzen [72]. Das wohl reaktivste Sauerstoffradikal ist das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), welches durch die Ein-Elektronenreduktion von molekularem O_2 vor allem in der Atmungskette entsteht. Aufgrund der hohen Reaktivität geht es schnell eine Verbindung mit anderen Molekülen ein, sodass weitere reaktive Sauerstoffspezies entstehen, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), das Peroxylradikal (ROO^{\cdot}) oder das Alkoxyradikal (RO^{\cdot}). Zu den stabileren molekularen Sauerstoffradikalen, die durch das Superoxidanion entstehen können, gehören das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroperoxid ($ROOH$) [73]. Es konnten mehrere Reaktionen im Mitochondrium als Produktionsort von ROS identifiziert werden. Hierzu gehören unter anderem Komplex I und III der Atmungskette, Dehydrogenasen wie die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase und die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase [74-76]. In Komplex I werden etwa 50 % des mitochondrial-gebildeten Superoxidanions generiert, zum einen an der Flavinmononukleotidstelle und zum anderen beim reversen Elektronentransfer aus dem Coenzym Q (CoQ) -Pool zurück zum Komplex I [77]. In den Komplexen II und IV der Atmungskette entstehen nur wenige reaktive Sauerstoffspezies. Komplex III und die

mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase erzeugen Superoxidanionen sowohl im Intermembranraum als auch in der Matrix [78].

Die mitochondriale ROS-Produktion besitzt eine wichtige physiologische Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen innerhalb der Zelle. So zum Beispiel kann ROS als „Schutzsignal“ dienen und antioxidative Enzyme in der Zelle erhöhen, um die Redox-Homöostase wiederherzustellen [73] oder angeborene Immunitätsprogramme zu aktivieren, wenn Krankheitserreger oder Umweltfaktoren die Zellfunktionen stören [77]. Überhöhte ROS-Konzentrationen können durch Kontrollverlust von Abläufen, insbesondere in der Atmungskette, hervorgerufen werden und wirken sich negativ auf die Struktur von Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden aus, was Veränderungen der biologischen Aktivität zur Folge haben kann [75, 79]. Studien, in denen mtDNA-Mutationen, die Lipidperoxidation und die Proteinoxidation untersucht wurden, zeigen, dass Mitochondrienstrukturen besonders anfällig für oxidative Schäden sind [80]. Neben Strukturveränderungen an Proteinen, die zwangsläufig mit Funktionseinschränkungen verbunden sind, führen hohe ROS-Spiegel zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran. Somit kann es zu einer gesteigerten Freisetzung von Cytochrom c kommen, was wiederum zur Apoptose der Zelle führen kann [81]. Des Weiteren sind die Entstehung von Karzinomen [82], Diabetes mellitus [83], neurodegenerative Erkrankungen [84] und Alterungsprozesse [85] mit erhöhten ROS-Werten assoziiert. Reaktive Sauerstoffspezies haben sowohl eine zellprotektive als auch eine zellschädigende Wirkung, was ihre Regulation in der Zelle sehr bedeutend macht.

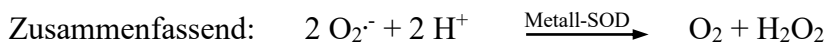
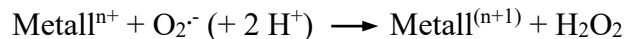
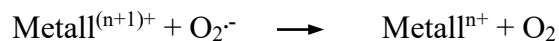
1.5.1 Antioxidative Verteidigung

Reaktive Sauerstoffradikale lassen sich durch Antioxidantien neutralisieren. Antioxidantien können in endogene und exogene Antioxidantien eingeteilt werden. Zu den exogenen Antioxidantien gehören zum Beispiel Phenole, Flavonoide, Phenolsäuren und Mineralien, während zum endogenen Antioxidationsystem Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT), die Glutathion-Peroxidase (GPx) und das Thioredoxin (Trx) gehören [86].

1.5.1.1 Enzymatisch wirkende Antioxidantien

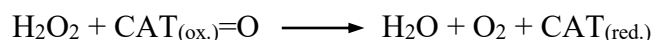
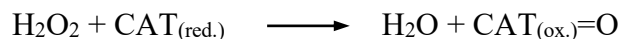
Die enzymatischen Antioxidantien stellen die effektivste Abwehr gegen erhöhte ROS-Spiegel in der Zelle dar [87]. Zu diesen gehören die SODs, CAT und GPx.

Basierend auf den metallischen Kofaktor im aktiven Zentrum der SODs werden diese in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: Kupfer-Zink-SOD (Cu/Zn-SOD; SOD 1), Eisen-SOD (Fe-SOD), Mangan-SOD (Mn-SOD; SOD 2) und Nickel-SOD (Ni-SOD). Alle vier SOD-Varianten konnten in Prokaryonten nachgewiesen werden. In Säugetieren hingegen spielen die zytosolische SOD 1, welche 90 % der gesamten SOD ausmacht [88], und die mitochondriale SOD 2, welche auch in Peroxisomen zu finden ist, eine bedeutende Rolle [89]. Die SODs katalysieren die Reaktionen von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff nach einem sogenannten „Ping-Pong-Mechanismus“, bei dem der metallische Kofaktor der SODs abwechselnd oxidiert und wieder reduziert wird [90]. Diese Reaktion läuft wie folgt ab [89].



Mitochondrien sind wichtige Produzenten von ROS und induzieren mit ansteigender Produktion die Expression von SOD 2, welche die Zelle vor oxidativen Schäden schützen soll [91]. Der katalytische Abbau von erhöhten Superoxidanionkonzentrationen durch die SOD 2 erfolgt zunächst sehr schnell und wird kurze Zeit später verlangsamt, um einen zu schnellen Anstieg von H_2O_2 zu vermeiden, welcher beispielsweise zur Apoptose der Zelle führen kann [92].

Das entstandene H_2O_2 wird überwiegend durch die CAT zu Wasser und molekularem Sauerstoff neutralisiert. Die CAT ist ein homotetrameres Enzym mit vier ~60 kDa schweren Untereinheiten, die je eine Hämgruppe im aktiven Zentrum enthalten [93]. Ähnlich wie bei der SOD unterliegt die katalytische Reaktion der CAT Oxidation und Reduktion nach folgender Reaktionsgleichungen [94].





Die Reaktionsgeschwindigkeit der Säugetier-Katalase gehört zu den höchsten enzymatischen Umsatzraten und ist proportional zur H_2O_2 -Konzentration [94].

Weitere wichtige antioxidative Enzyme sind die Glutathionperoxidasen (GPx), welche organische Peroxide und Wasserstoffperoxid unter Beteiligung des Glutathions (GSH) zu Wasser oder entsprechenden Alkoholen katalysieren [91]. Es gibt verschiedene Isoenzyme der GPx mit antioxidativer Funktion in verschiedenen zellulären Komponenten. Die GPx 1 kommt ubiquitär im Zytosol und in Mitochondrien vor, die GPx 2 im Zytosol und im Zellkern, wohingegen die GPx 3 nur im Plasma vorkommt. Die GPx 4 ist an intrazellulären Kompartimenten membranassoziiert, um diese vor oxidativem Stress zu schützen [95].

Der katalytische Zyklus der GPx besteht aus drei Reaktionsschritten (Abbildung 8). Im katalytischen Zentrum enthält die GPx einen Selenocysteinrest. Das Selen durchläuft bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid einen Redoxzyklus mit der aktiven Form Selenolat (GPx-SeH). Im ersten Schritt wird durch Bindung eines Peroxids (zum Beispiel H_2O_2) das Selenolat zu Selensäure (GPx-SeOH) oxidiert und es entsteht H_2O bzw. der entsprechende Alkohol des Peroxids. Die Selensäure reagiert mit einem GSH zu einem Selenulfidaddukt (GPx-SeSG). Ein weiteres GSH reduziert das GPx-SeSG unter Bildung eines oxidierten Glutathion-Disulfid (GSSG) und regeneriert somit die aktive Form der GPx [96].

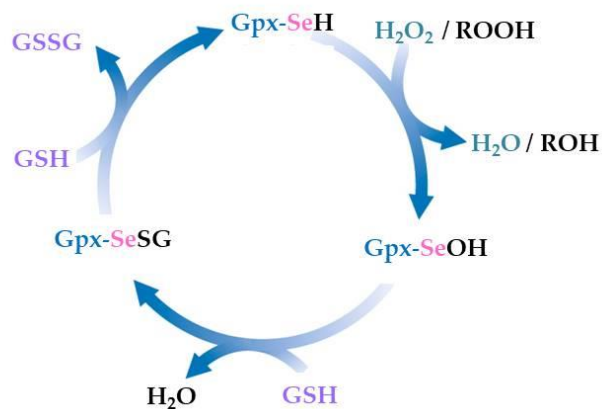
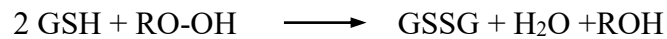


Abbildung 8: Katalytischer Zyklus der Glutathion-Peroxidase. (nach Stryer Biochemie (2018) [35]); -SeH: Selenolat, -SeOH: Selensäure, -SeSG: Selenulfid, GPx: Glutathion-Peroxidase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathion-Disulfid

Zusammengefasst werden im aktiven Zentrum der Glutathion-Peroxidase zwei Moleküle Glutathion zu Disulfid und Wasser oxidiert, während das Hydroperoxid zu dem entsprechenden Alkohol oder Wasser reduziert wird.



1.5.2 Entkoppler der Atmungskette

Neben den antioxidativen Enzymen verfügt die Zelle über die Möglichkeit, die Bildung von ROS über eine Entkopplung des Protonengradienten zu reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein geringfügiger Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials die ROS-Bildung induziert, während eine geringfügige Abnahme des Membranpotentials die ROS-Produktion verringern kann, ohne die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung stark zu beeinträchtigen. Daher könnte eine Entkopplung der Atmungskette die erste Verteidigungsstrategie gegen oxidativen Stress darstellen [97]. Die Entkopplung des mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungssystems wird durch die entkoppelnden Proteine Uncoupling Protein (UCP) 1-3 realisiert und stellt einen schnellen, jedoch energetisch kostspieligen Mechanismus dar, um die ROS-Produktion zu senken. Beim Entkopplungsprozess gelangen Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix, umgehen dabei die ATP-Synthase und verringern das Potential über der inneren Mitochondrienmembran [98]. Das am besten untersuchte UCP ist das UCP 1, welches ausschließlich im braunen Fettgewebe zu finden ist und dort eine Funktion in der Thermogenese ausübt [99]. Während UCP 2 ubiquitär in Geweben vorkommt, wird das UCP 3 fast ausschließlich im Skelettmuskel, im braunen Fettgewebe und geringfügig im Herzen exprimiert [100]. In einer Studie von Brand *et al.* konnte gezeigt werden, dass das in der Atmungskette erzeugte Superoxidanion erforderlich ist, um das durch UCP 2 vermittelte Protonenleck zu aktivieren [101]. In weiteren Studien anderer Arbeitsgruppen konnte eine verringerte mitochondriale ROS-Produktion bei einer Überexpression von UCP 2 nachgewiesen werden [102], während in UCP 2 Knockout-Mäusen das Gegenteil der Fall war [103].

1.6 Metabolisches Syndrom

Das metabolische Syndrom (MetS) ist keine eigenständige Erkrankung, sondern vielmehr eine multifaktorielle Stoffwechselstörung mit gleichzeitigem Auftreten mehrerer relevanter Krankheitssymptome. Es ist weltweit verbreitet und stellt einen Multiplex-Risikofaktor für atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen (ASCVD) und Type-2-Diabetes mellitus dar [104, 105]. Bereits 1965 beschrieben Avogaro und Creapaldi auf dem ersten Kongress „European Association for the Study of Diabetes“ (EASD) in Montecatini Terme (Italien) den Zusammenhang von Adipositas, Hyperlipidämie, Diabetes und Hypertonie mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit als „plurimetabolic syndrome“ [106]. In den 1970er Jahren wurde der Begriff „Metabolisches Syndrom“ durch Hanefeld geprägt [107] und wurde 1988 durch die Arbeit von Reaven *et al.* auch als Reaven-Syndrom oder Syndrom X bekannt [108]. Heute wird das MetS auch als Insulinresistenz (IR) -Syndrom, das tödliche Quartett [109] oder auch als „Wohlstands-Syndrom“ bezeichnet. Das MetS ist durch vier physiologische und biochemische Stoffwechselveränderungen charakterisiert: die abdominelle Fettleibigkeit, Bluthochdruck, veränderte Cholesterin- und Triglyceridwerte und eine Insulinresistenz [110]. Zusätzlich zu einer genetischen Prädisposition können eine Überernährung, eine verminderte körperliche Aktivität, das Alter sowie das Geschlecht einen Einfluss auf die Entstehung eines MetS haben [111]. Die Überernährung und die damit entstehende Fettleibigkeit ist ein wesentlicher Risikofaktor für das MetS. Besonders bedeutsam ist hier das viszerale Fettgewebe [112], welches durch die Messung des Taillenumfangs ermittelt werden kann. In Deutschland überschreiten etwa 40 % der Männer und etwa 50 % der Frauen über 45 Jahren den definierten Risikowert des Taillenumfangs [113]. Ab einem Alter über 50 Jahren steigt das Risiko zur Entwicklung eines MetS. So sind in Indien 25 %, in Europa 30 % und in den USA sogar über 40 % der Bevölkerung in der Altersklasse über 50 Jahre davon betroffen [111, 114]. Das MetS gilt weltweit als ein klinischer Marker zur Früherkennung von kardiovaskulären Erkrankungen und von Type-2-Diabetes mellitus. Menschen mit einem MetS haben im Vergleich zu gesunden Menschen ein zweimal so hohes Risiko zur Pathogenese einer kardiovaskulären Erkrankung und ein fünfmal so hohes Risiko, einen T2DM zu entwickeln [110]. Frauen mit einem höheren Körperfettanteil tendieren eher zur Entwicklung einer Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Glukoseintoleranz und einem gestörten Fettstoffwechsel als Frauen mit geringerem Körperfettanteil. Die Körperfettverteilung steht somit in einem engen

Zusammenhang mit dem MetS [109]. Für eine sichere Diagnose eines MetS müssen laut WHO (1998) drei der folgenden Risikofaktoren vorhanden sein [109, 115].

1. Die Serumtriglyceridkonzentration beträgt mehr als 150 mg/dl und der HDL-Cholesterolverwert im Serum sinkt bei Männern unter 35 mg/dl, bei Frauen unter 39 mg/dl.
2. Der BMI steigt über 30 kg/m² und der Taillenumfang beträgt bei Männern mehr als 102 cm und bei Frauen mehr als 89 cm.
3. Der Blutdruck steigt über 140/90 mmHg.
4. Der Nüchternblutglukosewert beträgt mehr als 100 mg/dl und es liegt eine beeinträchtigte Glukosetoleranz sowie eine Insulinresistenz vor.
5. Die Ausscheidungsrate von Albumin im Urin beträgt mehr als 20 µg/min oder das Verhältnis von Albumin zu Kreatinin ist größer als 30 mg/g.

Die Aufklärung der Ursachen eines MetS ist Gegenstand der Forschung. Die Pathophysiologie stellt sich sehr komplex dar, sodass die aktuelle Literatur teilweise kontrovers ist. Auch eine genetische Prädisposition spielt hierbei eine Rolle. Zudem wird der Einfluss von Mitochondriopathien diskutiert. Bei der Therapie des MetS steht zumeist die Behandlung der einzelnen Erkrankungen im Vordergrund. Ziel muss es allerdings sein, eine Stoffwechselbalance wiederherzustellen. Hierzu zählen eine Gewichtsreduktion, eine gesündere Ernährung und ein körperlich aktiver Alltag [109].

1.6.1 Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und einer Insulinresistenz

In einer Studie von Petersen *et al.* konnte 2009 mittels einer Kernspinresonanztomographie von humanem Leber- und Muskelgewebe gezeigt werden, dass eine Insulinresistenz bei älteren Patienten durch eine 40 %ige Reduktion der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung assoziiert sein kann [116]. Des Weiteren zeigte sich, dass Nachkommen von an Typ-2-Diabetes erkrankten Personen nicht nur eine Insulinresistenz zeigten, sondern auch eine etwa 30 %ige Reduktion der mitochondrialen Phosphorylierung im Vergleich zu einer nicht-insulinresistenten Kontrollgruppe aufwiesen [117]. Genetische Studien belegen, dass eine mitochondriale Dysfunktion Ursache für die Entstehung einer Insulinresistenz sein kann. In einem konplastischen Rattenmodell konnten Pravenec *et al.* eindeutig zeigen, dass Aminosäure-Substitutionen in

verschiedenen mitochondrialen Genen, die eng an die mitochondriale Funktion geknüpft sind, systemische Stoffwechselstörungen fördern können, die für verschiedene Risikofaktoren des T2DM relevant sind [118]. Auf Grundlage dieser Studien kann von einem direkten Zusammenhang zwischen einer mitochondrialen Dysfunktion auf der einen Seite und einer Insulinresistenz, der Entwicklung eines T2DM und dem MetS auf der anderen Seite ausgegangen werden.

1.6.2 Nichtalkoholische Fettlebererkrankung

Die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD - nonalcoholic fatty liver disease) gehört weltweit zu den häufigsten chronischen Lebererkrankungen und betrifft etwa 20 - 30% der westlichen Bevölkerung [119]. Die NAFLD ist wie das MetS ein multifaktorielles Erkrankungsbild. Eine gesteigerte Prävalenz der NAFLD kann durch verschiedene Krankheitsbilder wie dem T2DM, einem gestörten Fettstoffwechsel (Hyperlipidämie), Adipositas aber auch durch das Alter hervorgerufen werden [120]. Des Weiteren wird die NAFLD mit einer Hyperinsulinämie und einer Insulinresistenz assoziiert [121]. Es wird angenommen, dass eine Insulinresistenz ein wichtiger pathogener Faktor bei der NAFLD ist.

Die Erkrankung definiert sich über die Fetteinlagerung in den Hepatozyten. Übersteigt diese den Schwellenwert von 5 %, so spricht man von einer NAFLD, welche aufgrund einer Inflammation in eine nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) übergehen kann. Die NASH ist charakterisiert durch hepatozelluläre Verletzungen (Ballonierung, Apoptose/Nekrose, Mallorys Körper, Mitochondriopathie), Entzündungen und Fibrosen [122]. Im weiteren Verlauf kann es bei einer NASH durch Fibrosierung und Apoptose der Hepatozyten zur Leberzirrhose bis hin zum Leberkarzinom kommen. Eine leichte Form der NAFLD ist die „einfache Leberverfettung“ oder auch als nichtalkoholische Fettleber (NAFL) bekannt, bei der es zu keinen Leberzellschäden oder einer Inflammation kommt [123].

Als Ursache gelten neben einem ungesunden Lebensstil (geringe Aktivität, zu hohe Kalorienzufuhr) auch die übermäßige Fruktoseaufnahme [124]. Fruktose ist ein raffinierter Zucker, wird ausschließlich in der Leber abgebaut und kann ähnlich wie Ethanol zu einer Leberentzündung und zu einer Abhängigkeit führen. Aufgrund dieser Daten wird eine enger Zusammenhang von NAFLD und der alkoholische Fettlebererkrankung (ASH - alkoholische Steatohepatitis) diskutiert [125].

Während die Verfettung und Entzündung in der Leber zunächst reversibel sind, lässt sich eine Zirrhose nicht mehr rückgängig machen. Durch verschiedene Behandlungsstrategien wird versucht, die Ursachen zu beseitigen oder zu reduzieren, hauptsächlich das Übergewicht und die Insulinresistenz [121]. Dies gelingt vorwiegend durch Veränderung der Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten.

Aktuelle Daten aus klinischen, experimentellen und epidemiologischen Studien weisen darauf hin, dass die NAFLD als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms betrachtet werden kann [121, 126]. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass mitochondriale Veränderungen die Pathogenese der NAFLD begünstigen können [127, 128]. Es werden morphologische Veränderungen der Mitochondrien in der Leber, eine Abnahme der mtDNA, eine verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe sowie eine beeinträchtigte β -Oxidation in den Mitochondrien mit der NAFLD assoziiert [127, 129, 130]. Auf Grundlage dieser Daten, kommt es durch mitochondriale Dysfunktionen nicht nur zu einer erhöhten Fettansammlung in der Leber sondern auch zu einer Überproduktion von ROS, wodurch eine Leberentzündung und -fibrose induziert werden können [131].

1.7 Conplastische Mausstämme

Conplastische Mausstämme resultieren aus Inzuchtstämmen mit einer genetischen Veränderung des mitochondrialen Genoms. Während eines Rückkreuzungsprozesses werden weibliche Mäuse mit ihrem spezifischen mitochondrialen Genom mit männlichen Mäusen eines definierten Hintergrundstammes verpaart (Abbildung 9) [132]. In der Nomenklatur wird zuerst der Hintergrundstamm mit dem nukleären Genom genannt und anschließend hochgestellt der Mausstamm mit dem mitochondrialen Genom. Um einen genetisch stabilen conplastischen Mausstamm zu generieren müssen mindestens zehn Generationen gezüchtet werden.

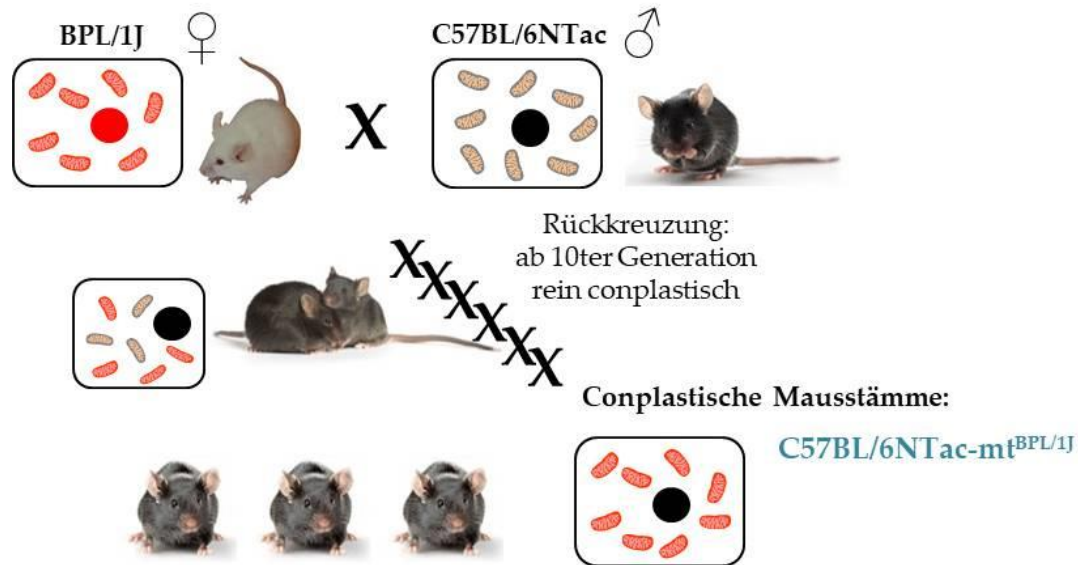


Abbildung 9: Kreuzungsschema zur Generierung eines conplastischen Mausstammes am Beispiel des C57BL/6NTac-mt^{BPL/1J}-Stammes [133]. Es wurden weibliche BPL/1J-Mäuse mit männlichen Mäusen des häufig genutzten Black 6-Mausstammes (C57BL/6NTac) verpaart, sodass nach einem Rückkreuzungsprozess von mindestens 10 Generationen der conplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mt^{BPL/1J} entstand.

In den letzten Jahrzehnten konnte durch Sequenzierung des mitochondrialen Genoms (mtDNA) gezeigt werden, dass verschiedene Varianten in der mtDNA während der Generierung von Inzuchtmausstämmen entstanden sind [134]. Yu *et al.* nutzen 2009 diese Erkenntnis, um 16 conplastische Mausstämme mit ein bis drei mtDNA-Polymorphismen zu generieren [133]. Diese conplastischen Mausstämme enthalten das nukleäre Genom des am weitesten verbreiteten Inzuchtmausstammes C57BL/6J (Black 6), welcher in den 1920ern im Jackson Labor entstand und somit das Suffix „J“ erhielt. Das National Institutes of Health (NIH) in den USA entwickelte vor einigen Jahrzehnten den Unterstamm C57BL/6N, welcher den Suffix „N“ bekam [135]. Mit diesem Mausstamm wurde ab 1991 von der Firma Taconic der C57BL/6NTac-Mausstamm gezüchtet [136], welcher in dieser Arbeit als Hintergrundstamm diente.

1.7.1 Forschung am conplastischen Mausmodell

In der Arbeit von Weiss *et al.* konnte in einem conplastischen C57BL/6NTac-mt^{FVB} (kurz mtFVB) Mausmodell mit einer Punktmutation im *Atp8*-Gen des Atmungskettenkomplexes V gezeigt werden, dass die Belastung mit einer Hochfettdiät (HFD) zu einem erhöhten ROS- und einem

erniedrigten ATP-Level in isolierten Pankreasinseln führt und damit eine metabolische Dysfunktion begünstigt [137]. Eine anschließende Langzeitstudie dieser HFD-gefütterten mtFVB-Mäuse zeigte eine Anpassung des Serumglukosespiegels mit zwei Peaks zu Alterszeitpunkten, in denen Stoffwechselstörungen zu einer Manifestation des Diabetes mellitus und des metabolischen Syndroms führen [138]. Analysen von blutbildenden Zellen im mtFVB-Mausstamm wiesen zu verschiedenen Alterszeitpunkten ohne signifikanten Effekt auf die Hämatopoese verringerte ROS-Level auf [139]. Des Weiteren konnten im selben conplastischen Mausstamm nach experimenteller Auslösung einer Autoimmunpankreatitis Ansammlungen von Lymphozyten nachgewiesen werden, welche vermutlich durch die Freisetzung von Gewebeantigenen ausgelöst werden und das Fortschreiten sogenannter autoimmun-ähnlicher Pankreasläsionen verstärken [140]. In einer Studie zur Pathologie der NASH konnte im mtFVB-Mausstamm eine Korrelation zwischen der *Atp8*-Mutation und der Mitochondrienfunktion in der Leber nachgewiesen werden, doch zeigte sich der Phänotyp einer NASH erst im Zusammenhang mit metabolischem Stress [141]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Mutation in einer mitochondrial-kodierten Untereinheit der Atmungskette die Anfälligkeit für die Entwicklung einer Stoffwechselstörung signifikant erhöht. In einem anderen conplastischen Mausmodell, dem C57BL/6NTac-mt^{NOD^{Lj}} (kurz mtNOD), welcher eine Punktmutation in der mitochondrial-kodierten COX3-Untereinheit trägt, konnten während des Alterungsprozesses neben einem erhöhten ROS-Level Veränderungen der mitochondrialen Morphologie und im Metabolismus auch ohne einen zusätzlichen Stressfaktor nachgewiesen werden [142]. Hierbei scheint eine Veränderung der mitochondrialen Calciumhomöostase eine Rolle zu finden [143]. Zusätzlich zeigten die mtNOD-Mäuse eine verkürzte Lebensdauer und Einschränkungen der physiologischen Fähigkeiten im Alter [144]. Einen positiven Effekt hingegen konnte in conplastischen C57BL/6J-mt^{ALR/Lj} Mäusen (kurz mtALR) mit einer ND2-Mutation im Komplex I der Atmungskette festgestellt werden. Die Mäuse zeigten eine erhöhte Komplex I - Aktivität, eine deutlich verringerte ROS-Produktion sowie geringere Level von Alterungsmarkern in Fibroblasten, sodass eine Beteiligung des *ND2*-Gens im Alterungsprozess und somit eine längere Lebensdauer postuliert wurden [145].

Diese Studien zeigen den Wert conplastischer Mausstämme zur Erforschung und dem besseren Verständnis der Pathogenese mitochondrialer Erkrankungen beim Menschen.

1.7.2 C57BL/6NTac-mt^{AKR/J} -Kontrollstamm

Der Kontrollmausstamm, im Folgenden als Kontrolle oder mtAKR-Mausstamm bezeichnet, ist ebenfalls ein conplastischer Mausstamm, welcher keine Mutation in den Atmungskettenkomplexen enthält. Der Kontrollmausstamm wurde ebenso wie der mtBPL-Mausstamm in der Arbeitsgruppe um Saleh Ibrahim im Institut für Dermatologie der Universität Lübeck 2009 generiert. In der Arbeit von Yu *et al.* wurde die mtDNA des mtAKR-Mausstammes als Referenzsequenz beschrieben [133]. Daher wurde der Mausstamm auch in dieser Arbeit als Kontrollmausstamm verwendet.

1.7.3 C57BL/6NTac-mt^{BPL/1J} -Mausstamm

In der vorliegenden Arbeit wurde der conplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mt^{BPL/1J}, im Folgenden als mtBPL-Mausstamm bezeichnet, untersucht. Yu *et al.* konnten mittels Sequenzierung zeigen, dass der BPL/1J-Mausstamm im Vergleich zum Hintergrundstamm in seinem mitochondrialen Genom zwei Punktmutationen besitzt (Abbildung 10) [133]. Bei beiden Mutationen des mtBPL-Mausstammes handelt es sich um einen Nukleotidaustausch. So befindet sich an der Position nt11902 ein Cytosin- anstelle eines Thymin-Nukleotids. Dieser Bereich der mtDNA gehört zum kodierenden Abschnitt der ND5-Untereinheit des Komplexes I der Atmungskette und ist das größte mitochondrial-kodierte Gen des Komplexes I. Der Nukleotidaustausch bewirkt in der Aminosäuresequenz einen Austausch von Phenylalanin zu Leucin. Die zweite Punktmutation betrifft die COX3-Untereinheit des Komplexes IV und befindet sich an Position nt9348, an welcher Adenin anstelle von Guanin eingebaut wurde. In der Aminosäuresequenz erfolgt somit ein Austausch von Valin durch Isoleucin.

In der kürzlich erst veröffentlichten Arbeit von Hirose *et al.* konnte gezeigt werden, dass der mtBPL-Mausstamm eine längere Lebensdauer und eine bessere Glukosetoleranz unter metabolischem Stress im Vergleich zum conplastischen Mausstamm mtALR aufwies [146].

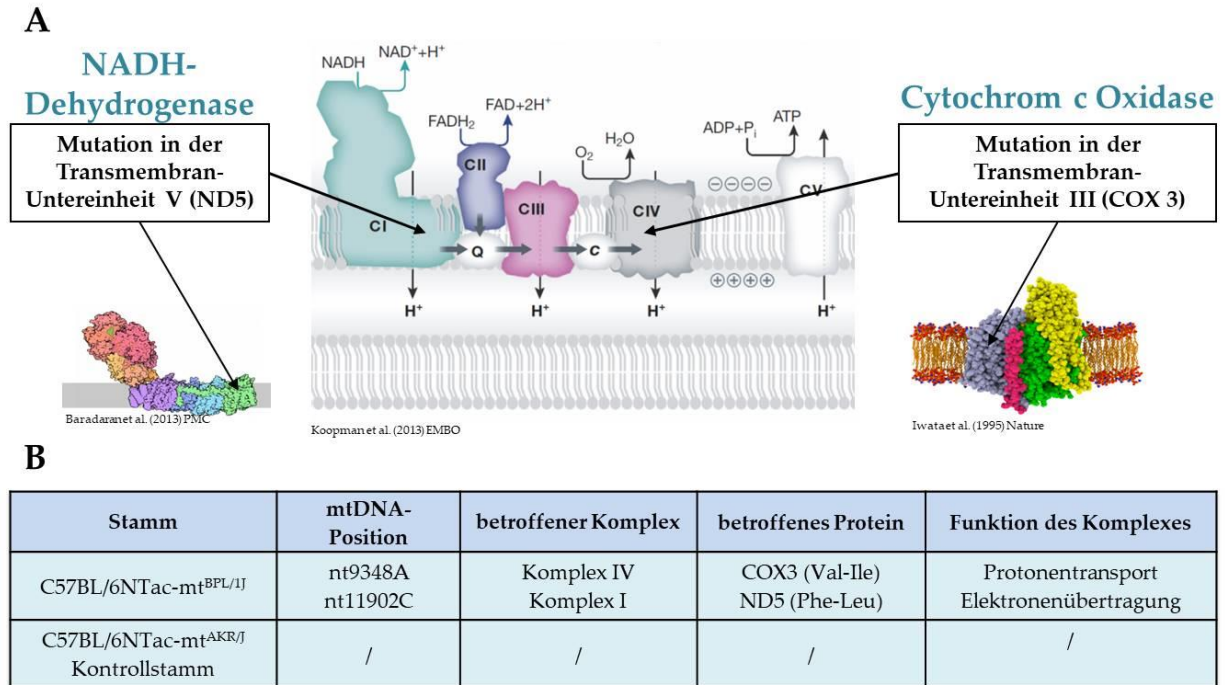


Abbildung 10: Punktmutationen des mtBPL-Mausstammes – (A) modifiziert nach Baradaran, Koopman und Iwata [11, 39, 147]. Die Mutationen liegen im proteinkodierten Bereich in der mtDNA und betreffen die Untereinheit ND5 des Komplexes I und die COX3-Untereinheit des Komplexes IV der Atmungskette. (B) Punktmutationseigenschaften des mtBPL-Mausstammes im Vergleich zum Kontrollstamm tabellarisch dargestellt.

1.8 Zielsetzung

Mitochondriale Veränderungen stehen im Fokus unterschiedlicher Pathomechanismen. Während der oxidativen Phosphorylierung werden in Mitochondrien als Nebenprodukte ROS generiert, welche je nach Ausmaß eine zellprotektive als auch eine zellschädigende Wirkung haben können. Bisher konnte gezeigt werden, dass mitochondrial-kodierte Mutationen in Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe zu einem veränderten ROS-Produktionslevel führen. Ein Anstieg von ROS wirkt sich negativ auf die Struktur von Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden aus, was eine Veränderung der biologischen Aktivität zur Folge haben kann. Mitochondrienstrukturen sind damit anfällig für oxidative Schädigung. Durch die mitochondriale Teilung und Fusion werden zelluläre Prozesse wie die ATP-Synthese aber auch beispielsweise die Calcium-Homöostase optimiert. Dysfunktionen in den Teilungs- und Fusionsprozessen führen zu einer gestörten mitochondrialen Dynamik in der Zelle, was besonders in Geweben mit einem hohen Energiebedarf, wie der Leber, zu mitochondrialen Erkrankungen führen kann. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass mitochondriale Veränderungen die Pathogenese der NAFLD begünstigen, welche als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms betrachtet werden kann. Die NAFLD wird mit morphologischen Veränderungen der Mitochondrien in der Leber, einer Abnahme der mtDNA-Kopienzahl, einer verminderten Aktivität der Atmungskettenkomplexe sowie mit einer beeinträchtigten β -Oxidation assoziiert. Besonders Schädigungen des mitochondrialen Genoms und eine Akkumulation von mtDNA-Mutationen, hervorgerufen durch ROS im Verlauf der Alterung, beeinflussen die Zellfunktion und können bis hin zur Apoptose führen.

Deshalb untersucht diese Arbeit Auswirkungen von mitochondrial-kodierten Mutationen in Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. Dazu wurde der conplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mtBPL/1J (mtBPL) im Vergleich zum ebenfalls conplastischen Kontrollstamm C57BL/6NTac-mtAKR/J (mtAKR) gezüchtet. Mutationen in der mtDNA können bis heute nicht zielgerichtet generiert werden. Der mtBPL-Mausstamm zeichnet sich durch zwei mtDNA-Punktmutationen aus, eine in der Untereinheit ND5 der NADH-Dehydrogenase und eine weitere in der COX3-Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase. Der Mausstamm C57BL/6NTac-mtAKR/J (mtAKR), welcher keine Mutationen im mitochondrialen Genom besitzt, aber ebenfalls conplastisch ist, wurde als Kontrollstamm verwendet. Die Untereinheit ND5 des Atmungskettenkomplexes I, der NADH: Ubichinon (Q)-Oxidoreduktase, hat eine essentielle Bedeutung für die Aktivität des Komplexes I. Des Weiteren kodiert die ND5-Untereinheit für eine

Helix, welche die Querverbindung des hydrophoben und des hydrophilen Arms von Komplex I verbindet und so eine wichtige Rolle im Aufbau und der Stabilisierung des Komplexes einnehmen könnte. Für die Untereinheit COX3 des Atmungskettenkomplexes IV, der Cytochrom-c-Oxidase, wird eine zentrale Funktion bei der Assemblierung und Stabilisierung des gesamten Komplexes postuliert.

Um Stoffwechseladaptationen und das Verhalten der mtBPL-Mäuse vergleichend zu mtAKR Mäusen im Alterungsprozess (12 Monate) aufzuklären, war es Ziel dieser Arbeit in beiden Mausstämmen:

1. physiologische Daten wie Körpergewicht, Organgewichte, Aktivität sowie den respiratorischen Quotienten und den Blutglukosegehalt zu bestimmen,
2. die mitochondriale DNA und die Expression der Atmungskettenkomplexe in der Leber zu untersuchen,
3. die Expression relevanter metabolischer Enzyme in der Leber zu analysieren,
4. die Fetteinlagerung in der Leber zu untersuchen,
5. die ROS-Produktion sowie oxidative Abwehrmechanismen in der Leber zu analysieren sowie
6. die mitochondriale Dynamik und regulierende Proteine der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsprozesse in der Leber zu untersuchen.

2 Methoden

2.1 Experimentelle Methoden

Für diese Arbeit wurden alle durchgeführten Experimente am Versuchstier Maus (*Mus musculus*) vorgenommen. Hierfür diente zum einen der conplastische Mausstamm mtBPL (1.7.2) und zum anderen der Kontrollmausstamm mtAKR (1.7.2), im Folgenden als Kontrolle bezeichnet. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse immer im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten untersucht.

2.1.1 Haltung der Versuchsmäuse

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltungseinrichtung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gezüchtet und gehalten. Gemäß den Empfehlungen der Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Untersuchung auf maustypische Pathogene. Die Mäuse wurden in Kohorten von zwei bis vier Tieren pro Käfig bei einer Raumtemperatur von $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sowie einer Tag-Nacht-Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser erhielten die Mäuse *ad libitum*. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei genehmigt (7221.3-1.1-061_10 und 7221.3-1-047_15).

2.1.2 Bestimmung des Körpergewichts der Maus

Das Gewicht der Mäuse wurde einmal monatlich und vor dem Versuch im Respirationssäfig am lebenden Tier, mittels einer Laborwaage von Omnilab (Sartorius, Göttingen, D) ermittelt. Bei einem Finalversuch wurde das Körpergewicht der Mäuse vor der Organentnahme am toten Tier gemessen.

2.1.3 Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die Blutglukosekonzentration der Mäuse wurde an der lebenden Maus durch Einritzen der Schwanzspitze gemessen. Hierbei wurde ein kleiner Tropfen Blut (ca. 3 µl) auf einen Teststreifen (Abbott, Wiesbaden, D) gegeben und mit Hilfe des Glukosemessgerätes Free Style mini (Abbott, Wiesbaden, D) die Blutglukosekonzentration gemessen.

2.1.4 Blutentnahme im Longitudinalversuch

Den Mäusen, welche für den Longitudinalversuch (Tierversuchsantrag 7221.3-1-047_15) zur Erfassung metabolischer Parameter eingesetzt wurden, wurde im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus entnommen. Hierfür wurden die Mäuse in eine kurze Vollnarkose durch Ether versetzt. Durch einen Griff in den Nacken der Mäuse wurde die Halsvene gestaut. Unter leichtem Druck und Drehbewegungen mit einer Kapillare im inneren Augenwinkel in Richtung gegenüberliegendem Kiefergelenk wurde der Venenplexus punktiert und etwa 50-100 µl Blut entnommen. Das Blut wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und anschließend 8 Minuten bei 4 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Nüchternserum, welches bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert wurde.

2.1.5 Bestimmung des Nüchtern-Seruminsulins

Der Nüchtern-Insulingehalt im Serum wurde mit Hilfe des „Mouse High Range Insulin ELISA“-Assays der Firma Alpco bestimmt. Dieser Assay beruht auf dem direkten „Sandwich“-Verfahren. Hierbei wird eine antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Nach Zugabe der Probe bindet das Antigen zunächst an den spezifischen Antikörper. Im Anschluss wird ein zweiter, gegen das Antigen gerichteter Antikörper hinzugefügt, an dem ein Enzym gekoppelt ist. Das gebundene Enzym ist in der Lage, einen hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren, sodass die Enzymaktivität je nach Menge des gebundenen Antigens photometrisch erfasst werden kann.

Die Standardproben und alle zu verwendenden Lösungen wurden im Assay mitgeliefert und wie im Protokoll angegeben gebrauchsfertig angesetzt. Zunächst wurde eine Standard-Verdünnungsreihe hergestellt, aus der später eine Eichkurve zur Bestimmung des Seruminsulingehaltes erstellt wurde. Die Serumproben wurden 1:10 verdünnt und je 5 µl pro Well

auf einer 96-Well-Platte pipettiert. Für die Standardreihe wurden 5 µl pro Well eingesetzt. Anschließend wurden 75 µl Konjugationslösung pro Well dazugegeben. Die Probenansätze wurden mit einer Klebefolie versehen und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 800 rpm durchmischt. Nach der Inkubationszeit folgten sechs Waschschrte mit je 350 µl Waschpuffer um unspezifische Antigene zu entfernen. Danach wurden 200 µl des Substrats TBM hinzupipettiert und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurden 50 µl Stopplösung hinzugefügt und nach kurzem Schütteln und Entfernen von eventuellen Luftblasen die Absorption bei 450 nm im Photometer Victor³ (Perkin Elmer) gemessen. Anhand der erstellten Standardgeraden konnte der Nüchtern-Seruminsulingehalt bestimmt werden.

2.1.6 Organentnahme aus der Maus

Für die Entnahme der Organe wurden die Mäuse mit CO₂ (CO₂-Durchflussgeschwindigkeit betrug 20 % des Kammervolumens pro Minute) abgetötet und mittels eines Scherenschnitts am Bauch in der Medianen von kaudal nach kranial geöffnet, wobei die Haut und die Bauchmuskulatur durchtrennt wurden. Weiterhin ist der Schnitt von der Mitte beginnend, nach links und rechts v-förmig erweitert worden. Zur Freilegung des Abdomens mit den darin befindlichen Organen wurden die durch den Scherenschnitt entstandenen Hautlappen nach links und rechts oben umgeklappt. Anschließend wurde das Zwerchfell durchtrennt und das Herz freigelegt, um mittels einer Herzpunktion etwa 0,5 - 1 ml Blut zu entnehmen. Nach der Blutentnahme erfolgte die Entnahme von Pankreas, Leber, Milz, Herz, Niere, Gonadalfett, Oberschenkelmuskel, braunem Fett und Gehirn, beginnend mit dem Pankreas. Die Organe wurden im Ganzen entnommen, gewogen, zerkleinert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur späteren Verwendung wie der RNA-, DNA- und Protein-Isolation sowie der Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.1.7 Bestimmung der submaximalen Laufleistung von Mäusen

Zur Bestimmung der physiologischen Fitness der Mäuse wurden insgesamt 160 Mäuse, je 10 Männchen und 10 Weibchen des Kontroll- und mtBPL-Mausstamms pro Alterszeitpunkt (3, 6,

9 und 12 Lebensmonate) einmalig auf ein computergesteuertes Laufband gesetzt. Das Laufband wurde so betrieben, dass die Mäuse zunächst zwei Minuten mit einer Geschwindigkeit von 15 m/min und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 38 m/min liefen. Sobald die Mäuse aufhörten zu laufen, wurde sie mit einem Stimulator zum Weiterlaufen animiert. Verweilten sie drei Sekunden oder länger am Stimulator wurde der Versuch beendet. Anschließend wurden die Mäuse mittels einer Dekapitation abgetötet und weitgehend entblutet. Es folgte die Entnahme der Organe (2.1.5), welche gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Bis zur Weiterverwendung wurden die Organe bei -80 °C asserviert.

2.1.8 Erfassung metabolischer und respiratorischer Parameter

In einer Longitudinalstudie wurden metabolische und respiratorische Parameter von Mäusen ermittelt. Hierfür wurden insgesamt 36 Mäusen, je neun männliche und neun weibliche Mäuse pro Gruppe im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten einzeln drei Tage lang in einem Stoffwechselkäfig gehalten. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Während der drei Tage wurde der Verbrauch von Futter (Standarddiät), Wasser und Sauerstoff sowie die CO₂-Freigabe und die Aktivität gemessen. Die computerermittelten Daten wurden für jeden Tag analysiert und die Durchschnittswerte aus den Daten der drei Tage je Maus berechnet. Die Mäuse kamen nach ihrem Aufenthalt in den Stoffwechselkäfigen wieder zurück in ihre Gruppen.

2.1.9 Analyse der ROS-Akkumulation in der Leber

Der „MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indikator“ (MitoSOX), welcher schnell und selektiv in die Mitochondrien gelangt, wurde zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies verwendet. MitoSOX™ ist ein Hydroxyethidiumderivat und wird im Mitochondrium durch Superoxidanionen zu 2-Hydroxyethidium oxidiert (Abbildung 11). Anschließend bindet das oxidierte MitoSOX™-Molekül an Nukleinsäuren, wodurch es rot fluoresziert und bei einem Absorptionsmaximum von 510 nm und einem Emissionsmaximum von 580 nm am Fluoreszenzmikroskop gemessen werden kann.

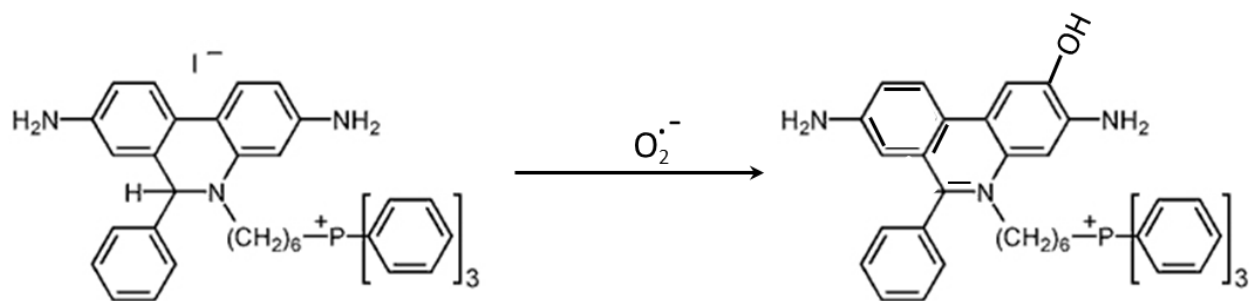


Abbildung 11: Oxidation von MitoSOX durch Superoxidanionen. Bei der Reaktion entsteht das rot fluoreszierende 2-Hydroxyethidium.

Den Mäusen wurden jeweils 100 µl MitoSOX™-Lösung im Alter von 3, 6, 9, und 12 Monaten intraperitoneal appliziert. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation abgetötet. Die Leber wurde entnommen und ein Teil davon in einem Einbettmedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Leberstücke wurden bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert. Von der Leber wurden Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 µm mittels Kryostat angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Zum Lösen des Einbettmediums aus dem Gewebeschnitt wurden die Objektträger 15 Minuten bei Raumtemperatur in eine Färbeküvette mit 1 x PBS gestellt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Roti®-Mount FluorCare, welches zusätzlich den Kernfarbstoff DAPI enthält, eingedeckt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10i und einem 60 x 1,35 UPLSAPO Ölimmersionsobjektiv wurden pro Gewebeschnitt fünf Bilder mit einer Detektionswellenlänge von 578 nm im Fluoreszenzkanal für den Farbstoff Tetramethylrhodamin (TRITC) detektiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms AutoQuant X2 ausgewertet. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität einzelner Bildpixel bestimmt, welche in einem Spektrum von 0 bis 4095 (dimensionslos) liegen kann. Um die Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, wurde als Grenzwert eine Fluoreszenzintensität von 50 festgelegt. Für eine Aussage über die ROS-Produktion im Gewebe wurde der prozentuale Anteil der Pixel bestimmt, deren Fluoreszenzintensität über dem Grenzwert lag.

2.1.10 Isolation von Hepatozyten

Den Mäusen wurde je nach Gewicht 0,02 - 0,04 ml eines Ketamin/Rompun-Gemisches im Verhältnis von 3:1 zur Narkose injiziert (Tierversuch 7221.3-1-047_15). Unmittelbar danach bekamen die Mäuse 0,5 µl Heparin gespritzt, um die Blutgerinnung zu hemmen. Anschließend wurde die Bauchdecke der Mäuse geöffnet und die Pfortader (*Vena portae*) freigelegt. Mit Hilfe einer in der Pfortader fixierten Perfusionsnadel wurde die Leber der narkotisierten Mäuse mit den Puffern I - III nacheinander mit 50, 30 und 20 ml perfundiert. Anschließend wurde die Leber im Ganzen entnommen und in eine auf Eis liegende, sterile Petrischale gegeben. Zum Herauslösen der Hepatozyten aus der Leberkapsel wurde die Leber mit einer Pinzette auf der Petrischale in Puffer IV geschwenkt. Die Zellsuspension wurde in ein mit Gaze überspanntes Becherglas überführt und mit Puffer IV übergossen, wodurch die herausgelösten Hepatozyten die Gaze passieren konnten, während unter anderem Reste des Bindegewebes herausgefiltert wurden. Die Hepatozyten wurden mit Puffer IV dreimal drei Minuten bei 4 °C und 50 x g zentrifugiert und somit von weiteren Gewebebestandteilen befreit. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 5 ml modifiziertem Williams E Medium resuspendiert und anschließend die Zellzahl und -vitalität unter einem Durchlichtmikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (2.1.10.1). Für die nachfolgenden Lebendexperimente wurden 100 000 vitale Hepatozyten in 6-Wellplatten mit modifiziertem Williams E Medium ausgesät. Die überschüssigen Hepatozyten wurden in 1 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, abzentrifugiert und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.1.10.1 Färben und Zählen der Hepatozyten

Zur Bestimmung von 100 000 vitalen Zellen, welche pro Well in den 6-Wellplatten ausgesät wurden, wurden 20 µl der Hepatozytensuspension mit 180 µl Trypanblau-Lösung (angesetzt nach Herstellerangaben) in einem Reaktionsgefäß versetzt und durch Schwenken gut durchmischt. Das gelöste Trypanblau bindet an Proteine und wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, wohingegen abgestorbene und perforierte Zellen dunkelblau angefärbt werden. Aufgrund der Zelltoxizität von Trypanblau wurden die Hepatozyten unmittelbar nach der Färbung in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Durchlichtmikroskop gezählt. Es wurden 2x vier Eckquadrate

der Zählkammer ausgezählt, wobei die Zellen auf nur zwei Grenzlinien mitgezählt wurden (Abbildung 12).

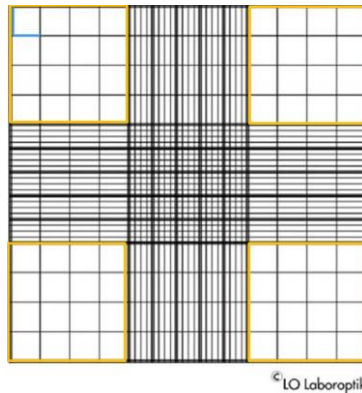


Abbildung 12: Zählquadrat einer Neubauerzählkammer; Es wurden 2x vier Eckquadratflächen (gelb) mit 16 kleineren Quadraten ausgezählt, wobei die Zellen von nur zwei Grenzlinien (blaue Linien) mitgezählt wurden

2.1.11 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Die RNA-Isolation aus Lebergewebe wurde mit dem „RNeasy® Mini Kit“ ausgeführt. Ein circa 30 mg schweres Leberstück wurde im gefrorenen Zustand in „Lysing Matrix D“ 2 ml-Reaktionsgefäßen mit 500 µl Lysepuffer (RTL-Puffer + 5 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen und im Vakuum-Homogenisator zweimal 40 Sekunden bei 12000 U/min homogenisiert. Anschließend wurde zur Trennung der freigelegten RNA von den restlichen Zellbestandteilen eine Fällung mit 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß durchgeführt. Der Probenansatz wurde 15 Minuten lang mit 14000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich 3 Phasen aus, wobei sich die RNA in der oberen Phase befand. Diese obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und mit 700 µl Ethanol (70 %) versetzt. Die Suspension wurde schrittweise auf eine Silicamembransäule des Kits (QIAshredder mini columns) gegeben und eine Minute zentrifugiert (12000 U/min). Dieser Schritt wurde wiederholt bis die Suspension vollständig durch die Silicamembransäule zentrifugiert war. Durch die Zentrifugation verblieb die gefällte RNA auf der Silicamembran, während sich andere Zellbestandteile wie zum Beispiel Proteine gelöst im Überstand befanden. Die Silicamembransäule mit der darin enthaltenen RNA wurde anschließend

zweimal per Zentrifugation (20 s, 12000 U/min) mit RW1-Puffer gewaschen. Um DNA-Kontaminationen zu beseitigen, wurden nachfolgend für 20 Minuten 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer auf die Säule gegeben. Es folgten ein Waschschriff mit RW1-Puffer und zwei Waschschriffe mit Ethanol-versetztem RPE-Puffer. Nach dem letzten Waschschriff wurde die RNA auf der Membran zwei Minuten bei 12000 U/min „trocken“ zentrifugiert und anschließend eine Minute in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die in Wasser gelöste RNA konnte mit Hilfe eines weiteren Zentrifugationsschrittes (2 min, 12000 U/min) die Silicamembran passieren und befand sich folglich im Filtrat. Dieses RNA-haltige Filtrat wurde in einem RNase-freiem Reaktionsgefäß bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.12 DNA-Isolation aus Lebergewebe

Die DNA-Isolierung aus dem Lebergewebe wurde mit dem „QIAamp DNA Mini - Kit“ ausgeführt. Zu circa 15 mg Lebergewebe wurden 180 µl ALT-Puffer und 20 µl Proteinkinase K gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 56 °C wurden zum Reaktionsansatz bei Raumtemperatur 4 µl RNase A (100 mg/ml) und nach weiteren zwei Minuten 200 µl AL-Puffer hinzupipettiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Zum Ausfällen der DNA wurden dem Reaktionsansatz 200 µl Ethanol (96 %) zugegeben und die gesamte Lösung auf eine Silicamembransäule pipettiert. Nach Zentrifugation der beladenen Silicamembransäule folgten nacheinander zwei jeweils 15-sekündige Waschschriffe bei 8000 U/min, ein Waschschriff mit AW1- und ein Waschschriff mit AW2-Puffer. Die DNA, welche sich an der Membran befand, wurde drei Minuten bei 14000 U/min „trocken“ zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die DNA in AE-Puffer eluiert, eine Minute inkubiert und eine weitere Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, um im Filtrat die gelöste DNA zu erhalten. Dieses DNA-haltige Filtrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.13 Photometrische RNA- und DNA-Konzentrationsbestimmung

Das photometrische Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit Hilfe der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) kann die Nukleinsäurekonzentration in der zu untersuchenden Lösung bestimmt werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml

doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Eine Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen kann durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt werden, da Proteine ein Absorptionsmaximum von 280 nm besitzen. Der Quotient OD_{230}/OD_{260} gibt Aufschluss über weitere Kontaminationen, beispielsweise mit Phenol. Diese beiden Quotienten lassen eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte bei einer DNA-Isolation 1,8 und bei einer RNA-Isolation 2,0 entsprechen. Der Quotient OD_{230}/OD_{260} liegt im Idealfall sowohl bei der DNA- als auch bei der RNA-Isolation zwischen 2,0 und 2,2. Bei einer Verunreinigung des Probenansatzes liegt der Wert unter 2,0.

Die Messungen für die Konzentrationsbestimmungen wurden am NanoDrop 2000 Photometer® in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Hierfür wurde 1 µl der RNA- bzw. der DNA-Probe auf die Messfläche des Photometers aufgetragen. Es wurde ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm gemessen. Anschließend wurden die Messdaten mit der Software NanoDrop 2000/2000c ausgewertet.

2.1.14 Reverse Transkription: cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus isolierter RNA aus der Leber der Maus wurde der Synthese-Kit „Maxima™ first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR“ verwendet, welcher sich aus einem Reaktions- und einen Enzym-Mix zusammensetzt. Der Reaktionsmix beinhaltet den Reaktionspuffer, dNTPs und Hexamer-Primer, während der Enzym-Mix die Reverse Transkriptase und RNase Inhibitoren enthält.

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg RNA, 4 µl Reaktionsmix aus dem Analysekit sowie 2 µl Enzym-Mix vermennt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler nachfolgendem Protokoll (Tabelle 2).

| Zeit [min] | Temperatur [°C] |
|------------|-----------------|
| 15 | 25 |
| 30 | 50 |
| 5 | 85 |
| ∞ | 4 |

Tabelle 2: Thermocycler-Protokoll zur cDNA-Synthese

Bei 25 °C binden die Hexamer-Primer an die RNA, mit deren Hilfe die Reverse Transkriptase aus RNA cDNA katalysiert. Hierbei entstehen zunächst RNA-DNA-Hybridmoleküle. Die RNA des Hybridmoleküls wird durch die zusätzliche RNase H-Aktivität der reversen Transkriptase abgebaut. Somit können zu der entsprechenden RNA komplementäre, doppelsträngige DNA (cDNA) synthetisiert werden. Um die Reaktion zu stoppen, erfolgt nach der cDNA-Synthese eine Hitzeinaktivierung bei 85 °C. Anschließend wird der Reaktionsansatz zügig auf 4 °C herunter gekühlt. Die synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.15 Real-Time TaqMan® PCR Analyse

Anhand einer Real-Time PCR (RT-PCR) mit dem Real-Time TaqMan® PCR Assay konnte die cDNA der Leberproben quantifiziert und so die Genexpression bestimmter Enzyme bzw. Proteine analysiert werden. Der TaqMan® PCR Assay beinhaltet eine Master-Mix-Lösung, welche die Taq-Polymerase, dNTPs und den Reaktionspuffer enthält, sowie spezifische Genexpressionssonden, zu denen genspezifische Primer und Oligonukleotidsequenzen gehören. Die sequenzspezifischen Sonden tragen ein Donor-Fluorochrom (Reporter) am 5'-Ende und ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) am 3'-Ende.

Primer und Sonden binden spezifisch an ihrer Zielsequenz. Dabei wird die gespeicherte Energie des Donor-Fluorochroms strahlungsfrei durch den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf das Akzeptor-Fluorochrom übertragen, wodurch die Donorfluoreszenz unterdrückt wird. Während der Elongationsphase der PCR wird die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase vom 5'-Ende her abgebaut, wodurch Donor- und Akzeptor-Fluorochrom räumlich voneinander getrennt werden. Dadurch findet die Fluoreszenz-Hemmung durch den FRET nicht mehr statt und die Donorfluoreszenz kann detektiert werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional

mit der Menge der PCR-Produkte zu und wird in der exponentiellen Phase der RT-PCR quantifiziert, denn nur in dieser Phase eines PCR-Laufs (bestehend aus mehreren Zyklen) herrschen optimale Reaktionsbedingungen, welche eine korrekte Quantifizierung ermöglichen. Als Maß für den Gehalt eines bestimmten Gens wird der Ct-Wert (cycle threshold) bestimmt, der den Anfang der exponentiellen Intensitätskurve der Fluoreszenz beschreibt. Die Kopienzahl der entsprechenden cDNA in der Probe ist umso höher, je niedriger der Ct-Wert ist.

Bei dem verwendeten Reporter-Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich jeweils um 6-FAM-Phosphoramidit (FAM). Für einen 10 µl Probenansatz wurden 5,5 µl TaqMan®-Mix, 2 x Universal-Master-Mix, 4 µl RNase-freies Wasser und 0,5 µl der spezifischen TaqMan® Genexpressions-Sonde eingesetzt. Pro Well einer 96-Well PCR-Platte wurden 10 µl des Probenansatzes vorgelegt und anschließend 1 µl der entsprechenden cDNA-Probe dazu pipettiert. Zum Schluss wurde die PCR-Platte mit einer klebenden Folie abgedeckt und die RT-PCR im Real-Time PCR-System „PikoReal 96“ von Thermo Scientific gestartet. Die RT-PCR wurde nachfolgendem Programm durchgeführt (Tabelle 3).

| rtPCR | Reaktionszeit [min] | Temperatur [°C] | 40 Zyklen |
|------------------|---------------------|-----------------|-----------|
| Enzymaktivierung | 2 | 50 | |
| Taq Aktivierung | 10 | 95 | |
| Denaturierung | 0,25 | 95 | |
| Elongation | 1 | 60 | |

Tabelle 3: Thermocycler-Protokoll für eine Real-Time PCR

Die Ct-Werte der Real-Time PCR wurden in einer Ausgabedatei (Format *.sds) gespeichert und mit dem gerätespezifischen Programm SDS RQ-Manager ausgewertet. Zur Bestimmung der relativen Genexpressionsrate eines bestimmten Gens wurde der ermittelte Ct-Wert zu einem Ct-Wert eines Referenzgens in der cDNA-Probe in Relation gesetzt. Für nukleär-kodierte Gene diente die Genexpressionsrate der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), während für mitochondrial-kodierte Gene die Genexpressionsrate der 16s-RNA als Referenz verwendet wurde.

2.1.16 Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl

Die mtDNA-Kopienzahl stellt ein Maß zur Mengenangabe der mitochondrialen DNA dar und wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des „NovaQUANT Mouse Mitochondrial to Nuclear DNA Ratio Kit®“ ermittelt. Hierbei wird das Verhältnis vom mitochondrialen Genom zum nukleären Genom in einer Probe bestimmt. Mittels rtPCR wurden die mitochondrialen Gene *trLEV* und *12S* sowie die nukleären Gene *BECN1* und *NEB* quantifiziert. In diesem Assay wurde für die PCR-Produkte der DNA-Farbstoff SYBR Green verwendet, welcher unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch dessen Fluoreszenzintensität während der PCR exponentiell ansteigen lässt. Je häufiger das zu detektierende Gen in der Probe vorliegt, desto schneller steigt die Fluoreszenzintensität von SYBR Green während der rtPCR an. Wie in Punkt 2.1.15 beschrieben wurde, konnten die Ct-Werte für die entsprechenden Gene bestimmt werden.

Im Kit enthalten war eine 96-Well-Mikrotiterplatte, auf der 24 Wells mit spezifischen Primerpaaren für die zu detektierenden Gene (*trLEV*, *12S*, *BECN1*, *NEB*) vorhanden waren. Zu 11,5 µl 2 x RT² Fast SYBR Green Mastermix® wurden jeweils 2 ng isolierte DNA der jeweiligen Probe pro Well dazupipettiert. Anschließend wurde die rtPCR mit dem 7900HT Fast Real-Time System nach folgendem Protokoll durchgeführt (Tabelle 4).

| rtPCR | Reaktionszeit [min] | Temperatur [°C] | 40 Zyklen |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------|
| Taq Aktivierung | 10 | 95 | |
| Denaturierung | 0,25 | 95 | |
| Elongation | 1 | 60 | |

Tabelle 4: Thermocycler-Protokoll der rtPCR zur Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl.

Die mtDNA-Kopienzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta CtA = Ct(BCN1) - Ct(trLEV)$$

$$\Delta CtB = Ct(NEB) - Ct(12S)$$

$$mtDNA\text{-Kopienzahl} = (2^{\Delta CtA} + 2^{\Delta CtB}) / 2$$

2.1.17 ATP- und ADP-Messung in Hepatozyten

Der ATP- und ADP-Gehalt in isolierten Hepatozyten wurde mit Hilfe des „ATPlite-Kit“ der Firma PerkinElmer® gemessen. Dieses ATPlite Assay System beruht auf dem Prinzip der Biolumineszenz des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*). Biolumineszenz bezeichnet die Emission von Licht, die durch chemische Reaktionen in lebenden Organismen hervorgerufen wird. Bei dem ATPlite Assay System werden in eine ATP-haltige Lösung ein Substrat mit D-Luciferin und das Enzym Luciferase gegeben. Dabei katalysiert die Luciferase die Reaktion von ATP, D-Luciferin und O₂ zu AMP, CO₂, Oxyluciferin und Licht. Im angeregten Zustand wird Licht in den Wellenlängen 560 - 562 nm emittiert, welches proportional zur ATP-Ausgangskonzentration der untersuchten Lösung ist.

In dieser Arbeit wurden jeweils 100 000 vitale Hepatozyten in 6-Well-Platten ausgesät und mit 2 ml modifiziertem Williams E Medium bedeckt. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre wurde das Williams E Medium abgezogen und die Hepatozyten dreimalig mit einfachem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl Lysepuffer inkubiert und 2 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur lysiert. Von den 200 µl Zelllysats wurden 70 µl zu 630 µl Puffer A gegeben, gemischt und auf zwei Ansätze mit jeweils 350 µl für die ATP- bzw. ADP-Messung geteilt. Die restlichen 130 µl des Zelllysats wurden für die Proteinbestimmung verwendet. Der Ansatz zur ADP-Messung wurde mit 19,5 µl Phosphoenolpyruvat (PEP) und 0,5 µl Pyruvatkinase (PK) versetzt. Hierbei katalysiert die Pyruvatkinase ADP und PEP zu ATP und Pyruvat. Im Dreifachansatz wurden anschließend 105,7 µl pro Well der zu untersuchenden Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µl Substrat des „ATPlite-Kit“. Parallel zu den Ansätzen der ADP-Messung wurden für die ATP-Messung im Dreifachansatz 100 µl der jeweiligen Probe in dieselbe Mikrotiterplatte pipettiert und mit je 50 µl Substrat des „ATPlite-Kit“ versetzt. Die Ansätze wurden 2 Minuten auf einem Schüttler im Dunkeln gut durchmischt und weitere 8 Minuten in einer lichtundurchlässigen Kammer stehen gelassen, um anschließend sofort die Messung der entstandenen Lumineszenz bei 562 nm im Photometer (Victor³) vorzunehmen. Als Referenz wurde eine Eichgerade erstellt, in der die gemessene Lumineszenzintensität bezogen auf die bekannten ATP-Konzentrationen aufgetragen wurde.

2.1.18 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels der BCA-Methode

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des Hepatozytenlysats wurde der „QuantiPro™ BCA Assay Kit“ der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen, welche durch die Aminosäuren Tryptophan, Cystein und Tyrosin realisiert wird. Die einwertigen Kupferionen reagieren mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem Komplex mit violetter Farbe. Dieser Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Höhe der Absorption ist proportional zur Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Lösung. Das „QuantiPro™ BCA Assay Kit“ beinhaltet die Lösungen A, B und C. Die Lösung A enthält den entsprechenden Reaktionspuffer während die Lösung B BCA (4 % w/v) und die Lösung C Kupfer(II)-sulfat (4 % w/v) in gelöster Form enthält. Diese Lösungskomponenten wurden im Verhältnis 25:25:1 gemischt. Die Zellsuspension aus Absatz 2.1.17 wurde mit PBS 1:20 verdünnt und davon je 100 µl pro Well im Dreifachansatz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zu diesen Ansätzen wurden anschließend 100 µl der angesetzten BCA-Kupfer(II)-sulfat Lösung gegeben. Die Ansätze der Mikrotiterplatte wurden kurz auf dem Schüttler durchmischt und danach eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Absorption bei 560 nm im Photometer (Victor³) gemessen. Als Referenz diente eine Eichgerade, welche aus einer BSA-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen erstellt wurde.

2.1.19 Analyse der mitochondrialen Netzwerkstruktur in Lebergewebe

Für die Analyse des mitochondrialen Netzwerks wurden Gewebeschnitte der Leber mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker® Deep Red (MTDR) angefärbt. MTDR diffundiert durch die Zellmembran, akkumuliert in den Mitochondrien und färbt somit selektiv das mitochondriale Netzwerk an. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 644 nm und das Emissionsmaximum bei 565 nm.

Mit Hilfe eines Kryostaten wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte der Leber von 3, 6, 9, und 12 Monate alten Mäusen angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Leberschnitte 10 Minuten in eiskaltes Aceton gestellt. Für eine gebrauchsfertige Färbelösung wurde MTDR im Verhältnis 1:20 000 mit 1x PBS verdünnt. In dieser MTDR-Färbelösung inkubierten die Gewebeschnitte in einer lichtundurchlässigen Küvette 30 Minuten bei 37 °C. Nach der Färbung wurden die Gewebeschnitte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Roti®-Mount

FluorCare DAPI eingedeckt. Dieses Eindeckmedium enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI und färbt die Zellkerne im Gewebe an. Die gefärbten und eingedeckten Gewebeschnitte wurden über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden jeweils fünf Bilder pro Leberschnitt mit dem Fluoreszenzmikroskop Fluoview FV10i und einem 60 x 1,35 UPLSAPO Ölimmersionsobjektiv aufgenommen. Hierbei wurde die emittierte Strahlung im Mito Tracker Red Kanal bei 598 nm detektiert. Angeregt wurde MTDR mit Licht einer Wellenlänge von 578 nm.

Bei einem intakten mitochondrialen Netzwerk ist die Struktur im Gewebe homogen und auch die Fluoreszenzintensität von MTDR erscheint gleichmäßig verteilt. Ist die Homogenität des mitochondrialen Netzwerks gestört, kommt es im Gewebe vermehrt zu Bereichen mit akkumulierten Mitochondrien. Aufgrund der erhöhten mitochondrialen Dichte in diesen Bereichen, ist auch die Fluoreszenzintensität dort erhöht. Zur Bestimmung der Homogenität des mitochondrialen Netzwerks im Lebergewebe wurden die Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm AutoQuant X2 ausgewertet. Hierfür wurde ein Grenzwert der Fluoreszenzintensität für die einzelnen Pixel in der jeweiligen Aufnahme festgelegt, welcher für diese Analyse mit dem Intensitätswert 100 definiert wurde. In Bereichen, in denen dieser Wert überschritten wurde, wurde die Mitochondriendichte als erhöht und somit die Homogenität des Netzwerks als gestört definiert. Des Weiteren wurde mit diesem Programm der prozentuale Anteil an Pixeln bestimmt, die den definierten Grenzwert überschritten, wodurch sich die Homogenität der mitochondrialen Netzwerkstruktur im Lebergewebe von Mäusen unterschiedlichen Alters in beiden Stämmen miteinander vergleichen ließ.

2.1.20 Triglyceridbestimmungen

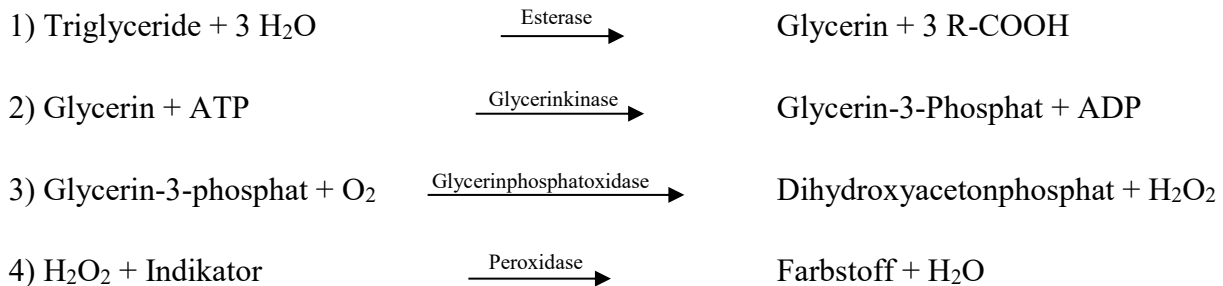
Der Nachweis der Triglyceride erfolgte sowohl im Serum als auch in der Leber mittels unterschiedlicher Methoden.

2.1.20.1 Triglyceridbestimmungen im Serum

Die Triglyceridbestimmung wurde mit dem Reflotron System der Firma Roche durchgeführt. Die Serumproben entstammten von abgetöteten Mäusen aus den Finalversuchen zur Organentnahme im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Für die Triglyceridbestimmung wurden 30 µl Serum

blasenfrei auf ein Reflotron-Teststreifen aufgetragen und im Reflotron System enzymatisch gemessen.

Enzymatische Reaktion:



2.1.20.2 Triglyceridbestimmung in der Leber

Die Triglyceridbestimmung erfolgte mit dem TRIGS Kit® (Randox). Hierbei werden hepatische Triglyceride durch Lipasen zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert. Das entstandene Glycerin wird zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert, welches anschließend unter Einbeziehung von molekularem Sauerstoff in Dihydroxyaceton, Phosphat und Wasserstoffperoxid gespalten wird. Das Wasserstoffperoxid wird zusammen mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol durch die Peroxidase zu Chinonimin, Salzsäure und Wasser umgesetzt. Diese Reaktion führt zu einem Farbumschlag von farblos zu pink, dessen Absorption photometrisch bei 500 nm gemessen und so die Menge der Triglyceride quantitativ ermittelt werden kann.

Zunächst wurden im Homogenisator circa 25 mg Lebergewebe in 0,5 ml HB-Puffer 10 Sekunden bei 14 000 rpm homogenisiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Enzyminaktivierung auf einen Schüttler bei 70 °C 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben weitere 5 Minuten auf Eis gekühlt und danach 10 Minuten bei 4 °C und 13 000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde geteilt, ein Aliquot für die Triglyceridbestimmung und ein weiteres für die Proteinbestimmung. Beim Auftreten einer Fettschicht oder eines trüben Überstands wurde die Probe resuspendiert, mit HB-Puffer 1:10 verdünnt und erneut zentrifugiert. Zusätzlich wurde vom Standard eine Eichreihe mit verschiedenen Konzentrationen (laut Herstellerangaben) hergestellt. Sowohl von der Eichreihe als auch von den Proben wurden im Dreifachansatz jeweils 10 µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, 150 µl

Enzymreagenz dazugegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde jeweils die Absorption am Photometer (Victor³) bei 490 nm gemessen.

2.1.20.3 Leber-Triglyceride: Nachweis mittels Oil Red O

Zur Visualisierung der Triglyceride im Lebergewebe wurde eine Oil Red O Färbung an fixierten Lebergewebeschnitten durchgeführt. Hierfür wurden 8 µm dicke Lebergewebeschnitte angefertigt und bei -80 °C gelagert. Die tiefgefrorenen Leberpräparate wurden zur Vorbereitung der Färbung für 10 Minuten in eine Färbeküvette mit eiskaltem Aceton gestellt und anschließend für 5 Minuten luftgetrocknet. Die Präparate inkubierten drei Minuten in absolutem 1,2-Propandiol bevor sie für etwa 10 Minuten in 60 °C warmer Oil Red O Gebrauchslösung gefärbt wurden. Nach dem Färben folgte ein zwei- bis fünfminütiger Differenzierungsschritt in 85 %igem 1,2-Propandiol. Anschließend wurden die Gewebeschnitte gründlich unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zum Färben der Zellkerne inkubierten die Präparate für weitere 20 Minuten in einer Hämatoxilin-Lösung nach Delafield. Durch Abwaschen der Präparate mit Leitungswasser ändert sich der pH-Wert und führt zu einem Farbumschlag von rötlich zu blauviolett. Nach der Bläuerung der Gewebeschnitte wurden diese mit Roti®-Mount Aqua Eindeckmedium (Roth) eingedeckt und das Deckgläschen mit Klarlack luftdicht an den Rändern versiegelt. Die Bildaufnahmen erfolgten durch 400-fache Vergrößerung am Mikroskop (IX81 von Olympus) und wurden mit der Software Xcellence rt 1.1 am Computer ausgewertet.

2.1.21 Proteinisolation aus Lebergewebe

Zur Isolation der Proteine aus dem Lebergewebe wurden circa 30 mg Leber mit 400 µl RIPA-Puffer versetzt, zur Homogenisierung mehrfach auf dem Vortexer durchmischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Probenansatz 30 Minuten bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand, welcher sich teilweise unter einer Fettschicht befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Bradford-Methode (2.1.22) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung zur Analyse der Proteinexpression bei -20 °C gelagert.

2.1.22 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford (1976) ist eine quantitative, photometrische Methode und beruht auf Wechselwirkungen der Proteine mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Für die Bradford-Methode war die Erstellung einer Eichgeraden notwendig, welche mit dem Standardprotein BSA erfolgte. Die Standardverdünnungsreihe wurde in jeweils 800 μl *Aqua dest* angefertigt (Tabelle 1). Die Proteinproben wurden auf Eis langsam aufgetaut, gut durchmischt und 1:15 mit *Aqua dest* verdünnt. Es wurden 5 μl dieser Proteinverdünnung zu 795 μl *Aqua dest* in eine Messküvette pipettiert. Anschließend wurden sowohl die Proben des Standards als auch die zu untersuchenden Proteinproben mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Farbstoff-Protein-Komplex bei seinem Absorptionsmaximum von 595 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnten die Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

| | Proben in μl | HPLC-H ₂ O in μl | Bradford-Reagenz in μl |
|--------------------------------------|-------------------------|--|-----------------------------------|
| BSA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] | 0 | 800 | 200 |
| | 2 | 798 | 200 |
| | 4 | 796 | 200 |
| | 8 | 792 | 200 |
| | 16 | 784 | 200 |
| | 25 | 775 | 200 |
| | | | |
| Proteinproben | 5 | 795 | 200 |

Tabelle 5: Reaktionsansätze der Proteinbestimmung nach Bradford

2.1.23 Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot

2.1.23.1 SDS-Gelelektrophorese

Als Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bezeichnet man eine Gelelektrophorese, bei der Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden.

Je 40 µg der aufgereinigten Proteinproben wurden mit 2 µl 4 x Lämmli-Puffer der Firma Bio-Rad versetzt, welcher SDS im Überschuss und β-Mercaptoethanol enthält. Der gesamte Probenansatz wurde mit *Aqua dest* auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Anschließend wurden die Proteine bei 95 °C denaturiert, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen und die Disulfidbrückenbindungen durch das β-Mercaptoethanol zu spalten. Das SDS in der Probe überlagerte die Eigenladung der Proteine, sodass diese eine einheitlich negative Ladung aufwiesen, und somit ausschließlich nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden konnten. Für die Gelelektrophorese wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Fertiggele verwendet, welche im ersten Teil der Gele, dem Sammelgel, die Proteinproben stark komprimierten und anschließend die Proteine im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht auftrennten. Als Marker wurde für den Western Blot der „Prestained Protein Standard All Blue“ (Bio-Rad) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer und wurde zunächst im Sammelgel bei 70 V und im Trenngel bei 100 V durchgeführt.

2.1.23.2 Western Blot: Semi-Dry-Verfahren

Nach der Gelelektrophorese wurde der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran nach dem „Semi-Dry“-Verfahren mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von Bio-Rad nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in Abbildung 13 dargestellt.



Abbildung 13: Aufbau des Semi-Dry-Blots

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Kontrolle 5 - 10 Minuten mit Ponceau S angefärbt, um die Banden zu visualisieren. Anschließend wurde die Membran mit *Aqua dest* wieder entfärbt.

2.1.23.3 Proteindetektion mittels Immunhistochemie

Nach der Proteinverlaufskontrolle mit Ponceau S wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit Odyssey Blocking Buffer, welcher 1:3 mit 1 x PBS verdünnte wurde, blockiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank auf dem Schüttler. Der Primärantikörper wurde wie in Tabelle 2.1.4 angegeben in Antikörperpuffer verdünnt und in einem Endvolumen von 10 ml auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran viermal je 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Waschpuffer vom ungebundenen ersten Antikörper gereinigt. Der zweite Antikörper, welcher fluoreszenzmarkiert war, wurde 1:5000 in Antikörperpuffer verdünnt und anschließend auf die Membran gegeben und eine Stunde im Dunklen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran viermal gründlich mit 1 x PBS gewaschen. Die Fluoreszenz wurde anschließend am Odyssey CLx-Imaging System (LI-COR) detektiert. Die Daten wurden am Computer mit Hilfe der Software Image Studio Lite Version 5.2 quantitativ ausgewertet.

2.1.24 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Diagramme wurde mit der Software GraphPad-Prism 5 erstellt. In Säulendiagrammen sind die Mittelwerte und die entsprechenden Standardfehler (SEM) der einzelnen Datengruppe dargestellt. Zum statistischen Vergleich der unabhängigen Datengruppen der Diagramme wurde ein One-Way-ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Der Signifikanzwert (p-Wert) wurde innerhalb der Diagramme in den Stufen *, \$, # ($P < 0,05$), **, \$\$, ## ($P < 0,01$) und ***, \$\$\$, ### ($P < 0,001$) angegeben. Das Symbol „*“ entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tierstämmen, während die Symbole „\$“ und „#“ jeweils für einen altersabhängig signifikanten Unterschied im Kontrollstamm beziehungsweise im mtBPL-Stamm stehen.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der conplastische Mausstamm mtBPL (C57BL/6NTac^{mtBPL/1J}) zu den Alterszeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monaten untersucht und mit dem Kontrollmausstamm mtAKR (C57BL/6NTac^{mtAKR/J}) verglichen. Männchen und Weibchen beider Stämme wurden in der Studie im Verhältnis von etwa 1:1 berücksichtigt.

3.1 Körpergewicht

Zur Ermittlung des Körpergewichtes wurden die Mäuse im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten gewogen. Es zeigte sich mit steigendem Alter eine Zunahme des Körpergewichtes sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Mäusen (Abbildung 14).

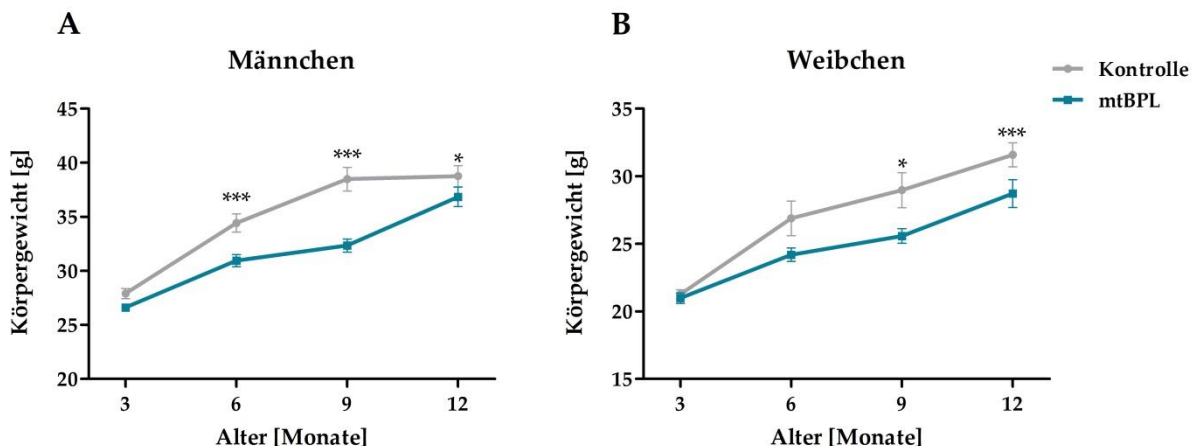


Abbildung 14: Körpergewicht von Kontroll- und mtBPL-Mäusen. Die männlichen (A) und weiblichen (B) Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen) zeigten eine altersabhängige Zunahme des Körpergewichts. (n=10-40 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni's Test)

Die weiblichen Mäuse in beiden Mausstämmen zeigten einen ähnlichen Verlauf der Gewichtszunahme, wobei die Weibchen des mtBPL-Mausstammes ab dem 6. Lebensmonat tendenziell leichter waren. Die männlichen Mäuse des Kontrollstammes nahmen bis zum Alter von 9 Monaten schneller an Gewicht zu als der mtBPL-Mausstamm, sodass sich zu diesem Alterszeitpunkt von 9 Monaten ein signifikanter Unterschied zeigte (Kontrollstamm: 36,6 g vs.

mtBPL-Mäuse: 33,1 g). Im Alter zwischen 9 und 12 Monaten nahm das Gewicht der männlichen Kontrollmäuse nur geringfügig zu, während die mtBPL-Mäuse etwa 10 % ihres Körpergewichts zunahmen.

3.2 Organgewichte

Parallel zur Bestimmung des Körpergewichtes wurden den Mäusen Leber, Muskel und Fett entnommen und untersucht. Die Organgewichte wurden als prozentualer Anteil am Körpergewicht und als absolutes Gewicht von männlichen und weiblichen Mäusen beider Stämme ermittelt.

3.2.1 Lebergewicht

Die Leber der männlichen und weiblichen Mäuse nahm im Alter von 3 Monaten in beiden Mausstämmen einen relativ großen Anteil am Körpergewicht ein (Abbildung 15 A und B). Dieses prozentuale Lebergewicht war im Alter von 3 Monaten in den mtBPL-Mäusen beider Geschlechter höher als in den Kontrollmäusen. Im Altersverlauf nahm das prozentuale Lebergewicht bei den Männchen beider Mausstämmen bis 9 Monate und bei den Weibchen bis 12 Monate ab. Absolut nahm das Lebergewicht mit dem Alter bei beiden Geschlechtern und in beiden Mausstämmen zu (Abbildung 15 D und E).

Im Alter von 12 Monaten zeigten die mtBPL-Männchen ein signifikant höheres absolutes Lebergewicht (Kontrollstamm: 1,49 g vs. mtBPL-Mäuse: 1,66 g) als die Kontrollmäuse (Abbildung 15 D). Bei den weiblichen mtBPL-Mäusen war die Leber im Alter von 9 Monaten verglichen zu den Kontrollmäusen signifikant leichter (Abbildung 15 E), nahm aber im Alter von 12 Monaten stark zu, wohingegen die Leber der Kontrollmäuse zu diesem Alterszeitpunkt nicht mehr an Gewicht zugenommen hatte. Fasst man beide Geschlechter zusammen (Abbildung 15 C und F) so zeigte sich eine prozentuale Gewichtsabnahme der Leber beider Mausstämmen, jedoch eine absolute Gewichtszunahme mit einem signifikant höheren Lebergewicht der mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten.

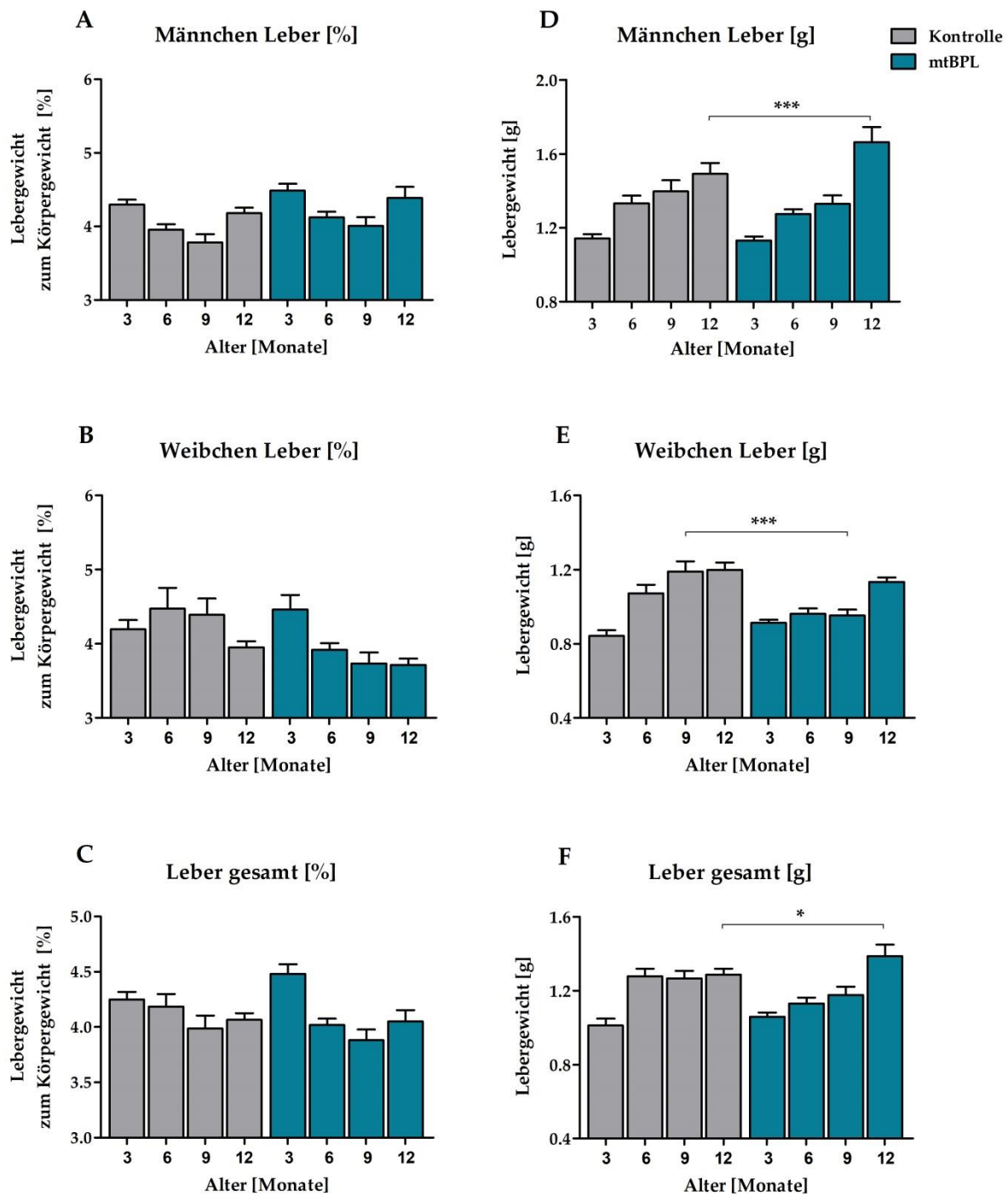


Abbildung 15: Lebergewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. Das Gewicht der Leber der männlichen (A, D) und weiblichen (B, E) Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) wurde prozentual zum Körpergewicht (A, B) als auch als absolutes Lebergewicht (D, E) dargestellt. Zusammengefasst wurden die Lebergewichte der beiden Geschlechter in Abbildung C und F. Im Alter von 3, 6, 9, und 12 Monaten wurden die Mausstämme miteinander verglichen. (n=15-40 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$, 1-way ANOVA/Bonferroni's Test)

3.2.2 Fettgewicht

Die Fetteinlagerung im gonadalen Fettgewebe reflektiert die Gewichtszunahme der Mäuse. Im Verhältnis zum Körpergewicht zeigten die männlichen Kontrollmäuse im Alter von 6 Monaten (Kontrollstamm: 4 % vs. mtBPL-Mäuse: 3,1 %) und die weiblichen Kontrollmäuse im Alter von 9 Monaten (Kontrollstamm: 4,1 % vs. mtBPL-Mäuse: 2,5 %) einen signifikant höheren gonadalen Fettanteil als die mtBPL-Mäuse (Abbildung 16 A und B). Des Weiteren zeigten die männlichen Kontrollmäuse sowohl im Alter von 6 als auch von 9 Monaten eine signifikant höhere absolute gonadale Fettmasse im Vergleich zu den mtBPL-Mäusen (Abbildung 16 D). Im Alter von 9 Monaten wiesen die Kontrollmäuse beider Geschlechter einen signifikant höheren Fettanteil auf als die mtBPL-Mäuse (Kontrollstamm: 4,6 % vs. mtBPL-Mäuse: 3,3 %), dies kehrte sich im Alter von 12 Monaten um (Kontrollstamm: 4,8 % vs. mtBPL-Mäuse: 5,4 %) (Abbildung 16 C).

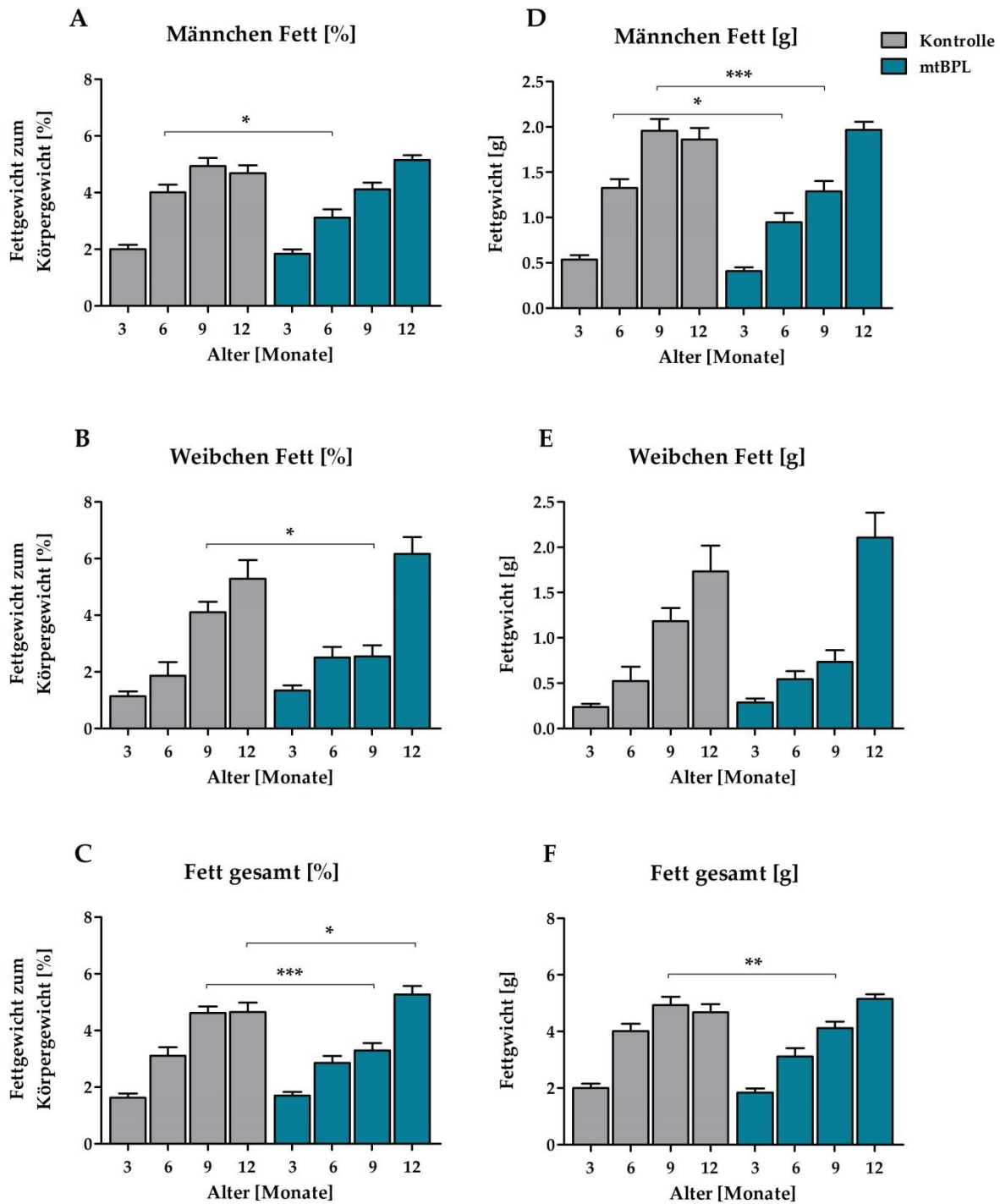


Abbildung 16: Fettgewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. Das Gewicht des gonadalen Fetts der männlichen (A, D) und weiblichen (B, E) Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen) wurde prozentual zum Körpergewicht (A, B) als auch als absolutes Fettgewicht (D, E) dargestellt. Zusammengefasst wurden das Fettgewichte der beiden Geschlechter in Abbildung C und F. Im Alter von 3, 6, 9, und 12 Monaten wurden die Mausstämme miteinander verglichen. (n=15-40 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05, 1-way ANOVA/Bonferroni's Test)

3.2.3 Muskelgewicht

Die Untersuchung der Muskelmasse wurde am *Musculus quadriceps femoris* exemplarisch für die gesamte Muskelmasse vorgenommen.

Der relative Muskelmassenanteil am Körpergewicht war in beiden Mausstämmen bei beiden Geschlechtern im Alter von 3 Monaten am höchsten (Abbildung 17 A-C), während das absolute Muskelgewicht zu diesem Alterszeitpunkt am geringsten war (Abbildung 17 D-F). Im Altersverlauf nahm der prozentuale Anteil der Muskelmasse am Körpergewicht in beiden Mausstämmen ab. Jedoch wiesen die männlichen mtBPL-Mäuse im Alter von 6 und 9 Monaten einen signifikant höheren Muskelmasseanteil auf als die Kontrollmäuse (Abbildung 17 A). Ab den 6. Lebensmonaten hatten die männlichen Kontrollmäuse eine gleichbleibende Muskelmasse (Abbildung 17 D) verglichen mit den männlichen mtBPL-Mäusen, deren Muskelmasse zu jedem weiteren Alterszeitpunkt zunahm. Bei den weiblichen Mäusen verhielt sich die altersabhängige Muskelmassezunahme genau umgekehrt zu den männlichen Mäusen. Die Kontrollmäuse nahmen im Altersverlauf an Muskelmasse zu, während die mtBPL-Mäuse im Alter von 6 Monaten ihr endgültiges Muskelgewicht erreicht hatten (Abbildung 17 E). Fasst man die Geschlechter zusammen und vergleicht die Mausstämme miteinander, so zeigte sich, dass es in beiden Mausstämmen zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat zu einer Zunahme der Muskelmasse kam. Danach nahm das Gewicht bis zum 12. Lebensmonat nur noch geringfügig zu (Abbildung 17 F). Der prozentuale Muskelmasseanteil in den Kontrollmäusen wurde mit dem 6. Lebensmonat geringer und blieb im weiteren Altersverlauf gleich. In den mtBPL-Mäusen wurde der prozentuale Muskelmasseanteil im Altersverlauf geringer, war jedoch zu den Alterszeitpunkten von 6 (Kontrollstamm: 1,06 % vs. mtBPL-Mäuse: 1,24 %) und 9 Monaten (Kontrollstamm: 1,04 % vs. mtBPL-Mäuse: 1,21 %) signifikant höher als in den Kontrollmäusen. Im Alter von 12 Monaten war der Muskelmassenanteil beider Mausstämme relativ gleich.

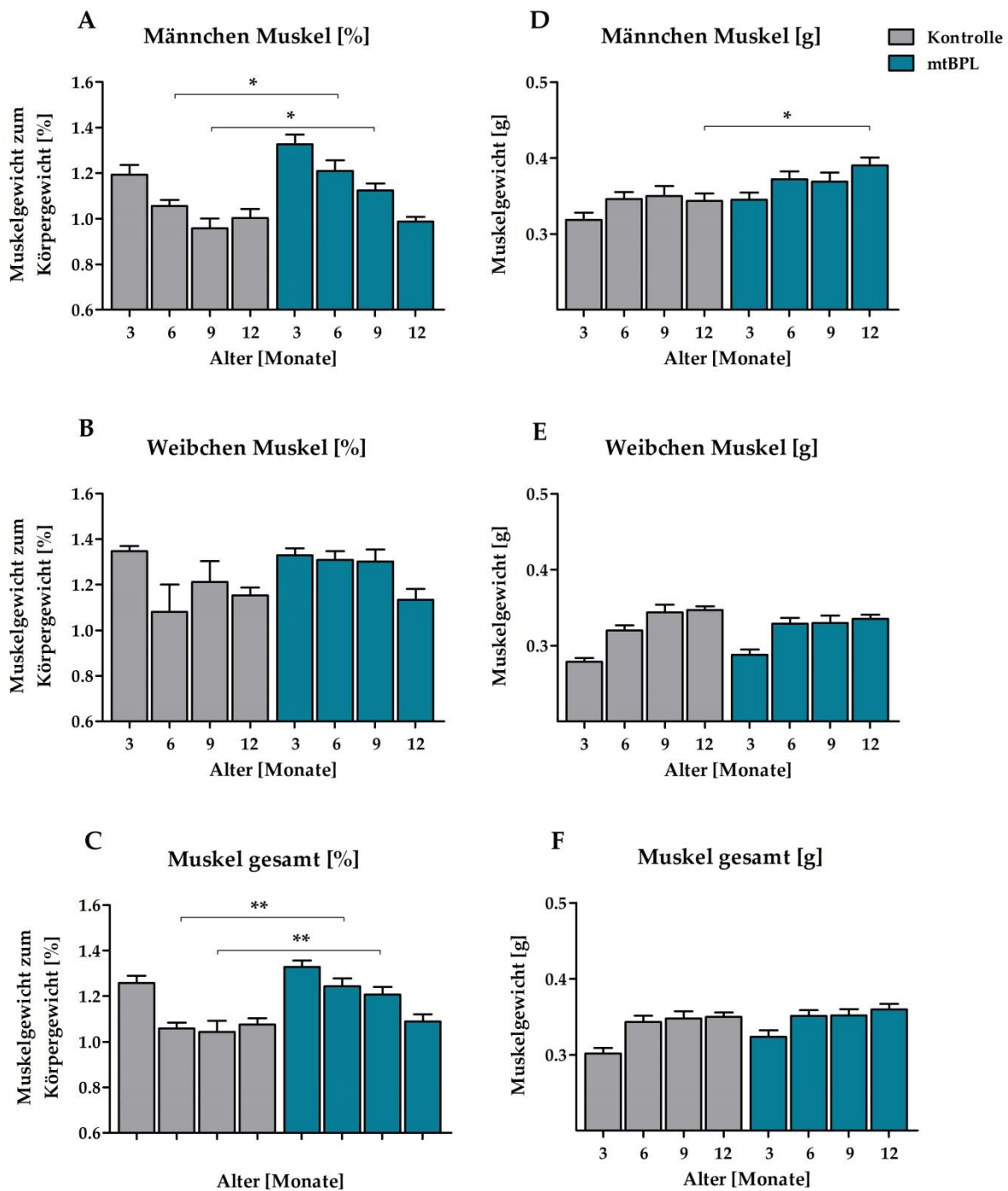


Abbildung 17: Muskelgewicht der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. Das Gewicht des Muskels der männlichen (A, D) und weiblichen (B, E) Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) wurde prozentual zum Körpergewicht (A, B), als auch als absolutes Muskelgewicht (D, E) dargestellt. Zusammengefasst wurden das Muskelgewichte der beiden Geschlechter in Abbildung C und F. Im Alter von 3, 6, 9, und 12 Monaten wurden die Mausstämme miteinander verglichen. (n=15-40 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, 1-way ANOVA/Bonferroni's Test)

3.3 Blutglukosekonzentration

Die Blutglukosekonzentration wurde parallel zur Körpergewichtsmessung alle drei Monate bestimmt. Bis zum Alter von 9 Monaten stieg die Nüchtern-Blutglukosekonzentration in den Kontrollmäusen kontinuierlich an und nahm im Alter von 12 Monaten wieder ab (Abbildung 18). Im mtBPL-Mausstamm zeigte sich hingegen bis zum Alter von 6 Monaten ein konstanter Nüchtern-Blutglukosespiegel, welcher anschließend zum 9-Monatszeitpunkt signifikant anstieg. Im Alter von 12 Monaten nahm die Blutglukosekonzentration, ähnlich wie in der Kontrolle, in den mtBPL-Mäusen wieder ab.

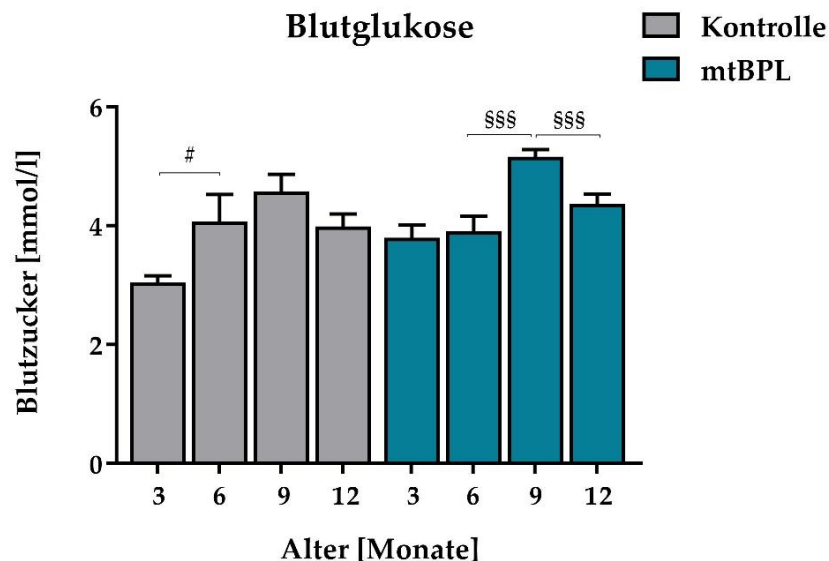


Abbildung 18: Blutglukosekonzentration der Kontroll- und mtBPL-Mäuse. Es wurde die Blutglukosekonzentration von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten gemessen. (n=12-58 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; # $p < 0,05$; \$\$\$ $p < 0,001$, t-Test)

3.4 Stoffwechselmessungen von Kontroll- und mtBPL-Mäusen

Respiration, Kalorienverbrauch und die Aktivität der Mäuse wurden in Stoffwechselkäfigen in einem Longitudinalversuch untersucht. Hierbei wurden Mäuse des mtBPL- und des mtAKR-Kontrollstammes alle drei Monate für jeweils 72 Stunden einzeln in einem Stoffwechselkäfig gehalten, um Sauerstoffverbrauch, Kohlenstoffdioxidabgabe, Futter- und Wasserverbrauch sowie die Aktivität zu dokumentieren.

3.4.1 Aktivität, Futter-, Wasser- und Kalorienverbrauch

Im Altersverlauf beider Mausstämmen nahm die Futtermenge pro Tag zu (Abbildung 19 A). Die Wassermenge pro Tag, die von den Mäusen aufgenommen wurde, nahm bei den Mäusen des Kontrollstammes bis zum Alterszeitpunkt von 9 Monate stetig zu, während die mtBPL-Mäuse im Alter von 3 bis 9 Monaten einen deutlich höheren Wasserverbrauch zeigten. Beide Mausstämmen nahmen im Alter von 12 Monaten etwas weniger Wasser auf als zu jüngeren Alterszeitpunkten (Abbildung 19 B).

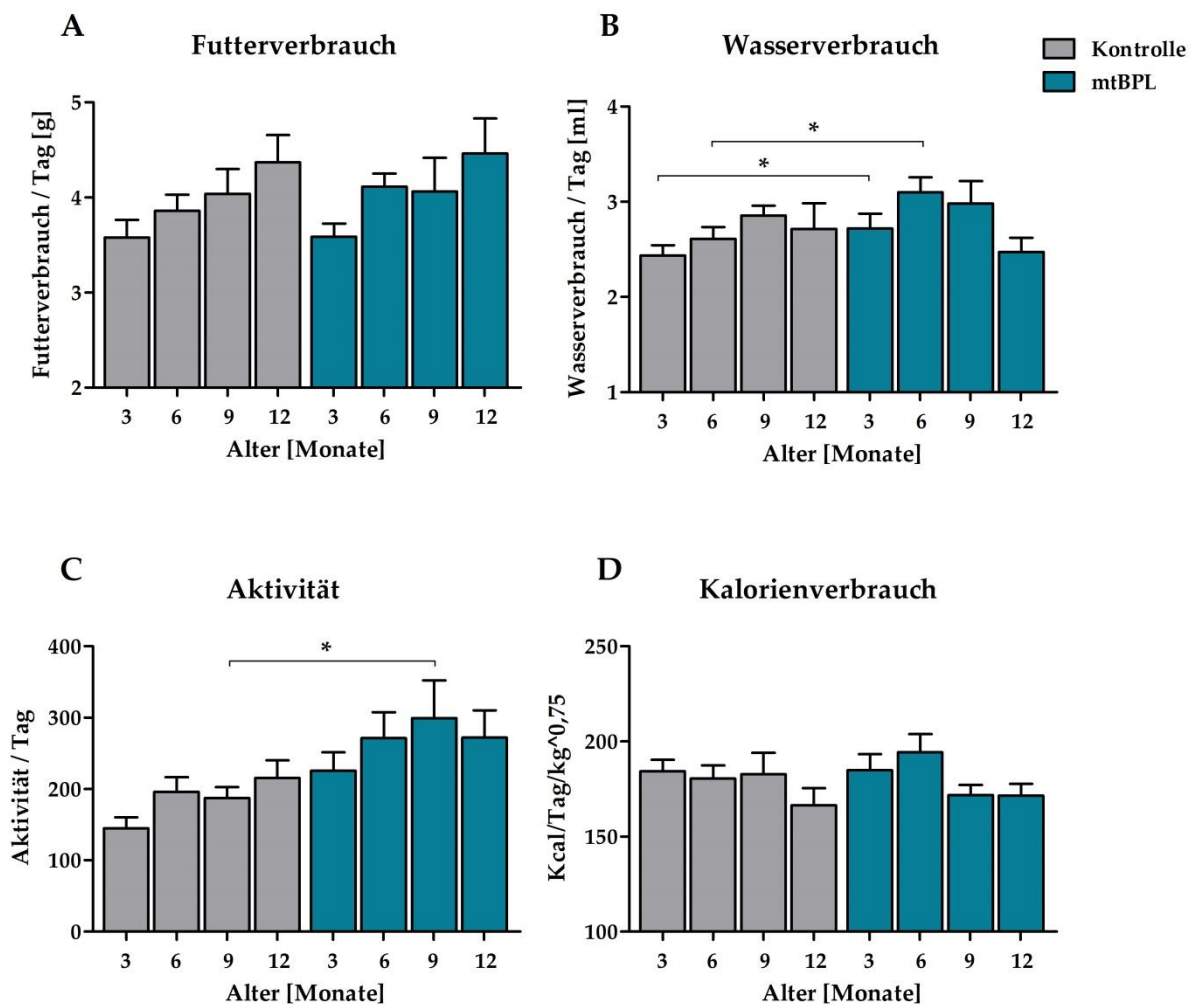


Abbildung 19: Futter- und Wasserverbrauch, Aktivität und Kalorienverbrauch im Tagesdurchschnitt. Im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten wurde die Futtermenge (A), der Wasserverbrauch (B), die Aktivität (C) und der Kalorienverbrauch (D) über drei Tage für Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen) bestimmt. Die männlichen und weiblichen Mäuse wurden zusammengefasst dargestellt. (n=5-12 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Bewegung der Mäuse durch Gewichtssensoren detektiert. Mäuse des Kontrollstammes steigerten ihre Aktivität pro Tag mit zunehmendem Alter geringfügig. Im Vergleich dazu zeigten die mtBPL-Mäuse bereits im Alter von 3 Monaten eine erhöhte Aktivität, welche bis zum Alterszeitpunkt von 9 Monaten weiter zunahm (Abbildung 19 C). Auch im Alter von 12 Monaten waren die mtBPL-Mäuse aktiver als die Kontrollmäuse. Aus der Aktivität und dem Futterverbrauch der Mäuse wurde der Kalorienverbrauch errechnet. Wie in Abbildung 19 D dargestellt, war der Kalorienverbrauch der mtBPL-Mäuse im Alter von 3 und 6 Monaten ähnlichen wie der der Kontrollmäuse. Im Alter von 12 Monaten sank der Kalorienverbrauch der Kontrollmäuse etwas ab, während die mtBPL-Mäuse ab 9 Monaten einen tendenziell geringeren Kalorienverbrauch hatten.

3.4.2 Respiratorischer Quotient

Bei der Haltung der Mäuse im Stoffwechselkäfig wurden auch Sauerstoffverbrauch und Kohlenstoffdioxidabgabe ermittelt und daraus der durchschnittliche respiratorische Quotient pro Tag bestimmt (Abbildung 20).

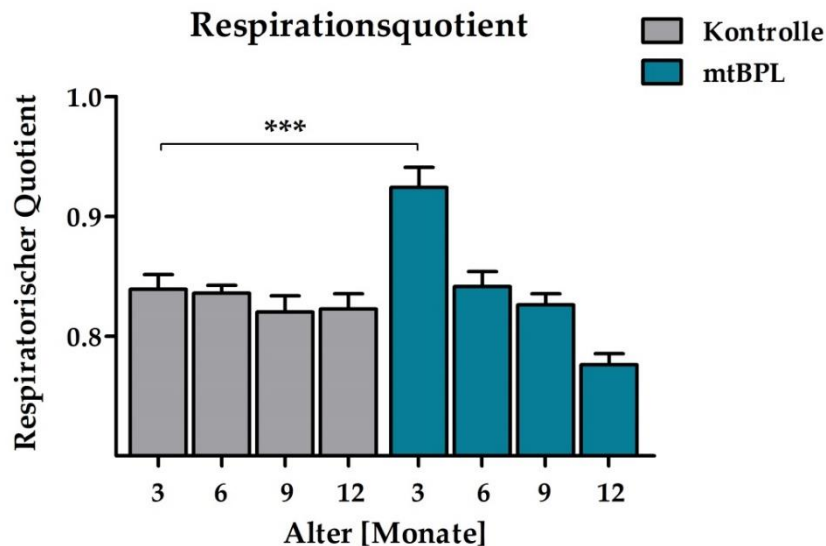


Abbildung 20: Respiratorischer Quotient. Im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten wurde der respiratorische Quotient von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) ermittelt. Die männlichen und weiblichen Mäuse wurden zusammengefasst dargestellt. (n=10-18 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

Für den Kontrollstamm ergab sich ein altersunabhängiger respiratorischer Quotient zwischen 0,82 - 0,84. Im Gegensatz dazu lag der respiratorische Quotient 3 Monate alter mtBPL-Mäuse bei 0,92 und fiel dann bis zum Alter von 12 Monaten auf 0,77 ab.

3.4.3 Genexpression ausgewählter Stoffwechselenzyme

3.4.3.1 Genexpression der Glucokinase

Die Genexpression der Glucokinase (*GCK*) nahm sowohl im Kontroll- als auch im mtBPL-Mausstamm im Altersverlauf ab (Abbildung 21). Verglichen mit der Genexpression im Kontrollmausstamm wurde die *GCK* im mtBPL-Mausstamm im Alter von 3 bis 9 Monaten signifikant geringer exprimiert. Im Alter von 3 Monaten lag die *GCK*-Genexpression der mtBPL-Mäuse bei 63 % und im Alter von 12 Monaten schließlich nur noch bei 55%, während die *GCK* im Kontrollmausstamm in diesem Alter noch zu 66 % exprimiert wurde.

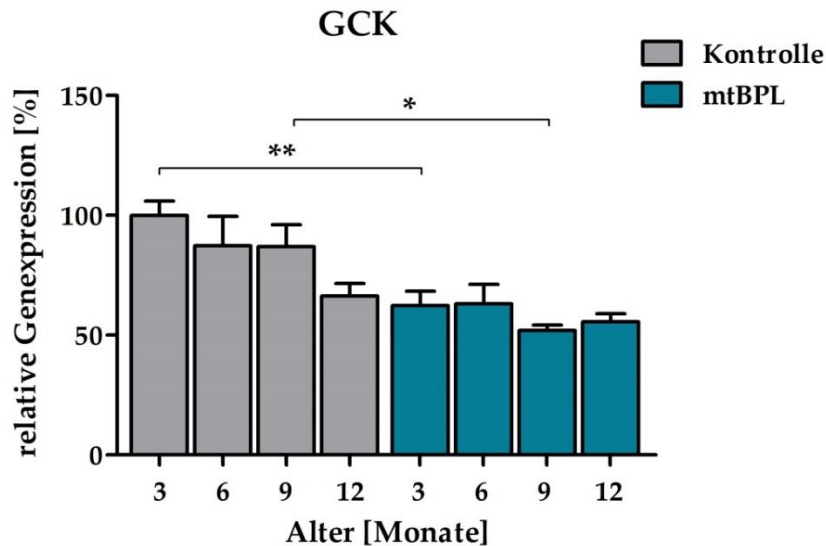


Abbildung 21: Genexpressionsmuster der Glucokinase in der Leber. Dargestellt ist die relative Genexpression der *GCK* in der Leber von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM: * p < 0,05; ** p < 0,01; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.4.3.2 Genexpression der Pyruvatcarboxylase

Die Analyse der Genexpression der Pyruvatcarboxylase (*PCX*) im Lebergewebe zeigte einen altersabhängigen Anstieg der *PCX* in beiden Mausstämmen. Der höchste *PCX*-Wert im Kontrollmausstamm konnte im Alter von 9 Monaten gemessen werden (Abbildung 22 A). Im mtBPL-Mausstamm lag die Genexpression der Pyruvatcarboxylase verglichen mit dem 3 Monatszeitpunkt der Kontrollmäuse im Alter von 3 Monaten bei 140 % und stieg bis zum Alter von 12 Monaten weiter an. Dieser Anstieg der *PCX*-Genexpression in den mtBPL-Mäusen führte im Alter von 12 Monaten zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu altersgleichen Kontrollmäusen (Kontrolle: 115 % vs. mtBPL: 190 %).

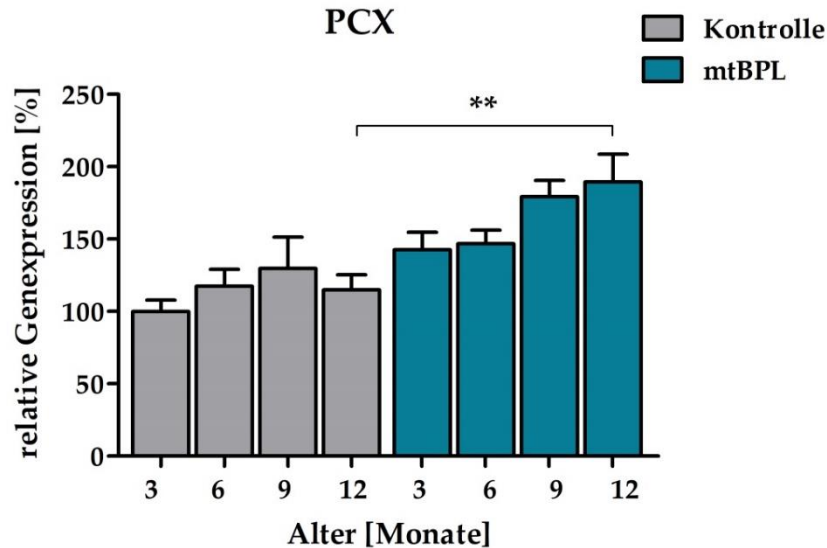


Abbildung 22: Genexpressionsmuster der Pyruvatcarboxylase in der Leber. Dargestellt ist die relative Genexpression von *PCX* des Kontroll- (graue Säulen) und des mtBPL-Mausstammes (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; ** p < 0,01; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.4.3.3 Genexpression der Fettsäuresynthase

Die Genexpressionsanalyse der Fettsäuresynthase (*FASN*) im Lebergewebe zeigte im mtBPL-Mausstamm zu allen Alterszeitpunkten im Durchschnitt eine höhere Expression als im Kontrollmausstamm (Abbildung 23). Die Genexpression *FASN* der Kontrollmäuse lag bis zum Alter von 9 Monaten bei 100 % und wurde im Alter von 12 Monaten auf 170 % gesteigert. Der

FASN-Genexpressionslevel der mtBPL-Mäuse war im Alter von 3 Monaten mehr als dreimal so hoch als im Kontrollmausstamm (Kontrolle: 100 % vs. mtBPL: 331 %). Im Alter von 9 Monaten zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der *FASN*-Genexpression. Der Genexpressionslevel der mtBPL-Mäuse war im Alter von 12 Monaten nur geringfügig niedriger als zum 9-Monatszeitpunkt.

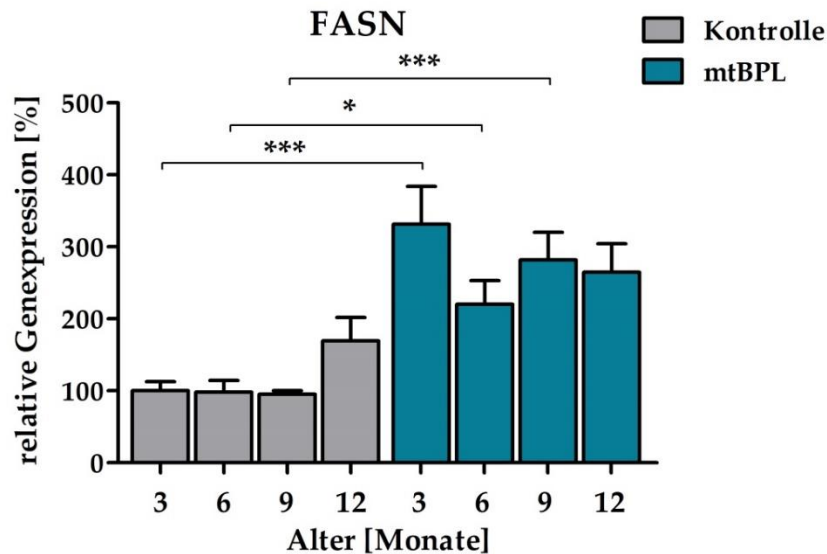


Abbildung 23: Genexpressionsmuster der Fettsäuresynthese in der Leber. Dargestellt ist die relative Genexpression der *FASN* des Kontroll- (graue Säulen) und des mtBPL-Mausstammes (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM: ** p < 0,01; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.4.3.4 Genexpression des Sterol regulatory element-binding transcription factor 1

Im Kontrollmausstamm wurde im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten eine konstante Genexpression des *SREBF 1* im Lebergewebe ermittelt (Abbildung 24). Im jungen Alter von 3 und 6 Monaten war die *SREBF 1*-Genexpression im mtBPL-Mausstamm geringfügig höher und lag bei 125 % im Vergleich zu den 3 Monate alten Kontrollmäusen. Mit 9 Monaten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der *SREBF 1*-Genexpression auf 220 % in den mtBPL-Mäusen. Im Alter von 12 Monaten sank Expression schließlich in den mtBPL-Mäusen auf 185 % etwas ab.

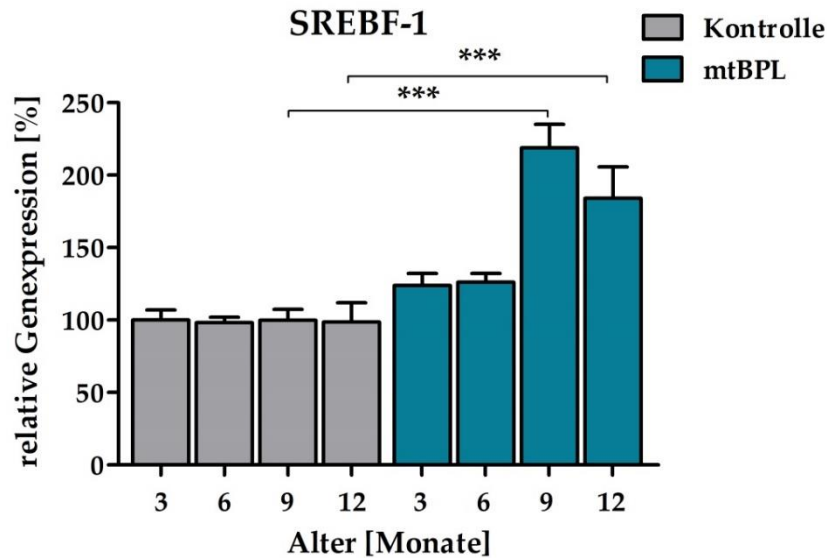


Abbildung 24: Genexpressionsmuster der Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 in der Leber. Dargestellt ist die relative Genexpression von *SREBF-1* im Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mausstamm (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM: *** p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.4.3.5 Genexpression der Carnitin-Palmityltransferase 1 α

Die Genexpressionsanalyse der Carnitin-Palmityltransferase 1 α (*CPT 1 α*) im Lebergewebe von Kontrollmäusen zeigte im Altersverlauf bis zum Alter von 9 Monaten eine konstante Genexpression (Abbildung 25) von etwa 100 %, welche im Alter von 12 Monaten auf 127 % anstieg. Die *CPT 1 α* –Genexpression im mtBPL-Mausstamm wurde mit zunehmendem Alter verstärkt exprimiert. Im Alter von 3 Monaten lag das Genexpressionslevel der *CPT 1 α* in der Leber von mtBPL-Mäusen bei etwa 115 % verglichen mit den Kontrollmäusen zum gleichen Alterszeitpunkt. Bis zum Alter von 12 Monaten stieg die *CPT 1 α* -Genexpression in der Leber der mtBPL-Mäuse auf 160 % an.

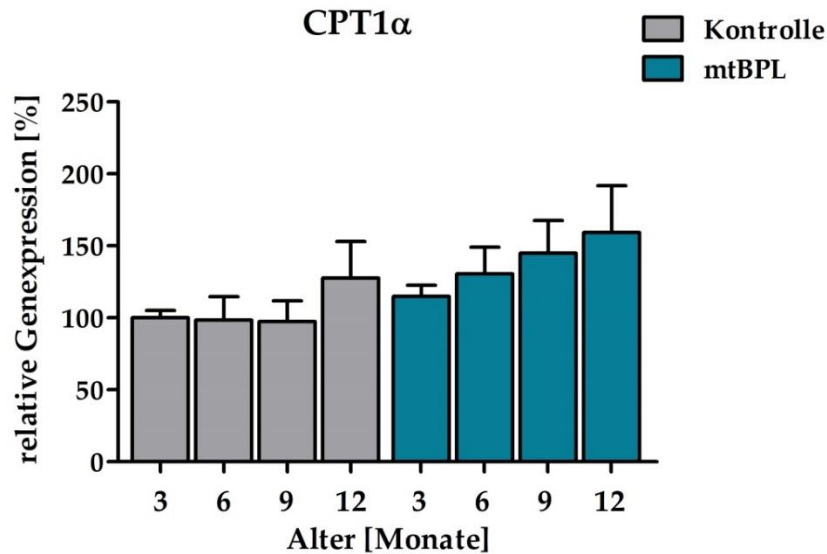


Abbildung 25: Genexpressionsmuster der Carnitin-Palmityltransferase 1 α in der Leber. Dargestellt ist die relative Genexpression der *CPT1 α* des Kontroll- (graue Säulen) und des mtBPL-Mausstammes (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.5 Fetteinlagerungen im Lebergewebe

Aufgrund des erhöhten absoluten Lebergewichtes der mtBPL-Mäusen im Alter von 12 Monaten (Abbildung 15 D und E) wurde die Leber beider Mausstämme auf Fetteinlagerungen untersucht. Zur Bestimmung des Fettanteils im Lebergewebe wurden Lebergewebeschnitte mit Oil Red O angefärbt, mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops analysiert und anschließend mit der Xcellence Rt Software am Computer hinsichtlich der angefärbten Fläche quantifiziert.

In beiden Mausstämmen zeigte sich mit zunehmendem Alter eine erhöhte Fetteinlagerung (Abbildung 26 A). Schon im Alter von 3, 6 und 9 Monaten konnte eine tendenziell höhere Fetteinlagerung in den mtBPL-Mäusen ermittelt werden. Die Fetteinlagerung nahm bei den Kontrollmäusen ab 9 Monaten nicht weiter zu. Im Gegensatz dazu lagerten die mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten signifikant mehr Fett ins Lebergewebe ein (Kontrolle: 0,24 % vs. mtBPL: 1,99 %). In Abbildung 26 B wurden Beispielbilder von 12 Monate alten Mäusen beider Stämme dargestellt. Neben dem erhöhten Fettanteil in der Leber der mtBPL-Mäuse konnte auch eine Vergrößerung der Fettvakuolen beobachtet werden.

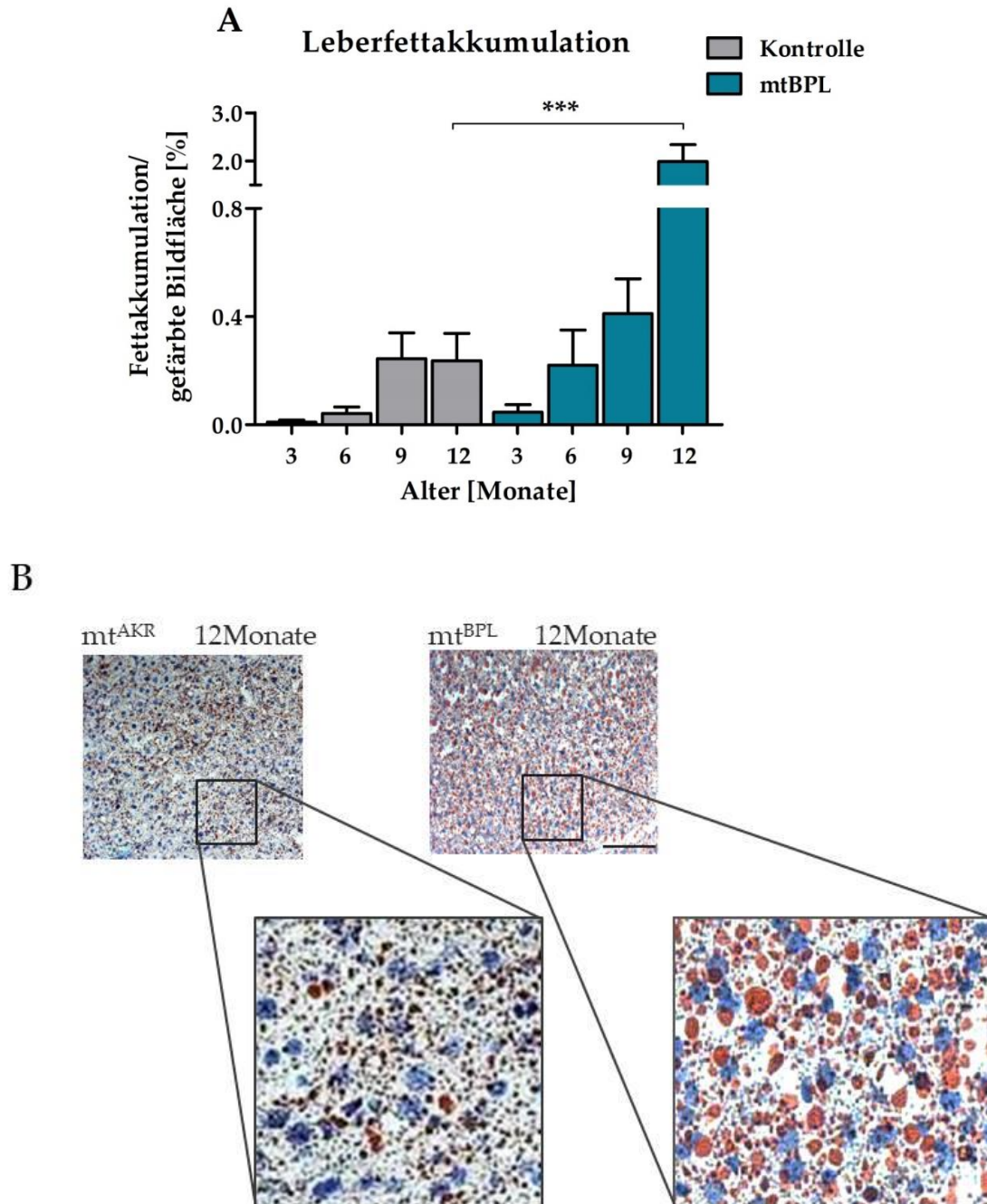


Abbildung 26: Fetteinlagerungen im Lebergewebe. (A) Quantitative Auswertung zur Fetteinlagerung im Lebergewebe auf Grundlage von Oil Red O gefärbten Gewebeschnitten von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) wurde als Säulendiagramm dargestellt. Es wurde der prozentuale Flächenanteil der Fettakkumulationen in den Bildaufnahmen mit einer Farbtintensität oberhalb eines Schwellenwertes (> 20) bestimmt. ($n=5$ Bilde von 8-10 Mäusen; Mittelwert in $\% \pm \text{SEM}$; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur) (B) mit Oil Red O gefärbte Beispielbilder. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3 und 12 Monate alter Kontroll- und mtBPL-Mäusen. Rote Flächen (gelbe Pfeile) entsprechen Fettvakuolen im Lebergewebe.

3.5.1 Triglyceridgehalt in der Leber

Zur weiteren Untersuchung der Fetteinlagerung in der Leber wurde die Bestimmung des Triglyceridgehalts mit Hilfe des TRIGS Kit® durchgeführt. Im Kontrollmausstamm zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Triglyceride mit zunehmendem Alter (Abbildung 27). Die mtBPL-Mäuse zeigten im Alter von 6 Monaten eine ähnliche Zunahme der Lebertriglyceride wie bei den Kontrollmäusen, welche bis zum 9-Monatszeitpunkt konstant blieb. Im Alter von 12 Monaten zeigte sich in der Leber der mtBPL-Mäuse ein signifikant höherer Triglyceridgehalt als in den Kontrollmäusen (Kontrolle: 14 % vs. mtBPL: 28 %).

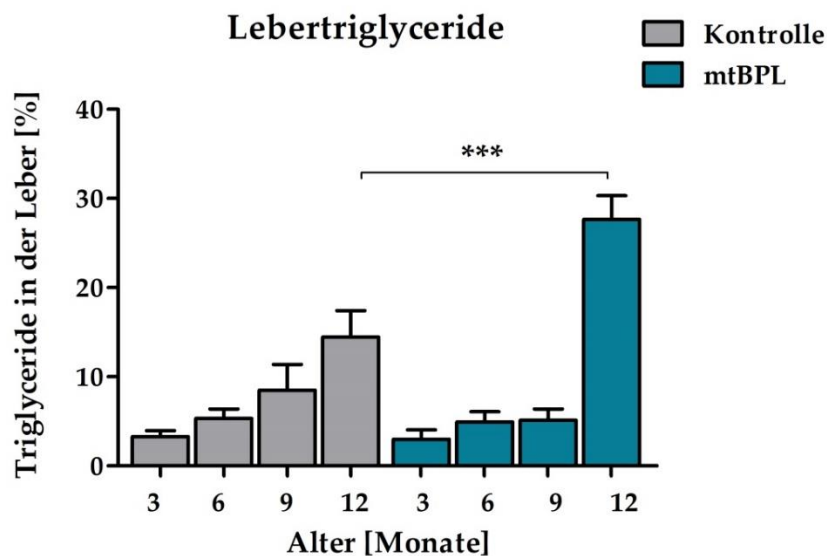


Abbildung 27: Triglyceridgehalt in der Leber. Dargestellt ist der relative Triglyceridgehalt im Lebergewebe von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. Hierbei wurde der prozentuale Triglyceridanteil zur Gesamtleber bestimmt. (n = 5 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM: *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.5.2 Triglyceridgehalt im Serum

Neben der Bestimmung des Triglyceridgehaltes in der Leber wurde dieser auch im Serum in beiden Mausstämmen bestimmt. Die mtBPL-Mäuse zeigten im Serum einen gleichbleibenden Triglyceridspiegel mit zunehmenden Alter (Abbildung 28). Im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten zeigte der Kontrollmausstamm hingegen einen leicht ansteigenden Triglyceridgehalt.

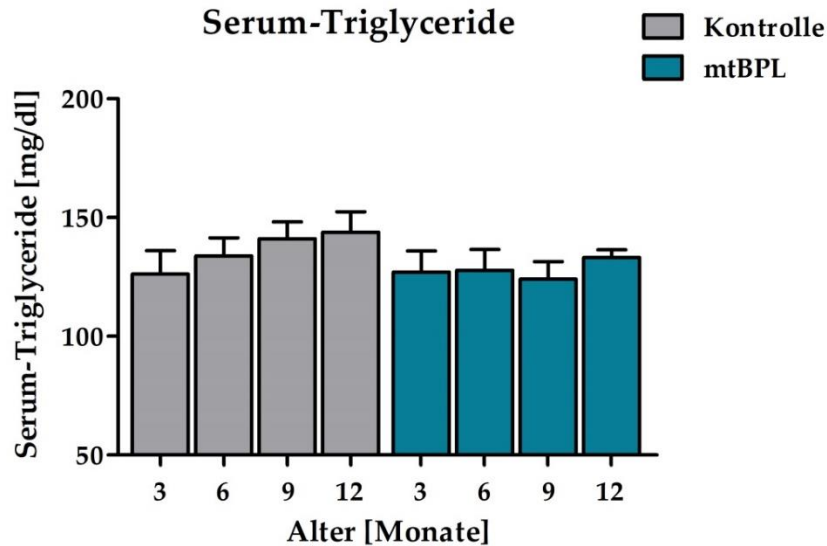


Abbildung 28: Triglyceridgehalt im Serum. Dargestellt ist der Triglyceridgehalt im Serum [mg/dl] von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten. (n = 5-20 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.6 ATP- und ADP-Gehalt in Hepatozyten

Um eine Aussage über den Energiegehalt in der Leber von Kontroll- und mtBPL-Mäusen treffen zu können, wurde der ATP- sowie der ADP-Gehalt in isolierten Hepatozyten gemessen. Der Kontrollmausstamm zeigte im Alter von 3 und 6 Monaten eine signifikant erhöhte ATP / Protein-Ratio im Vergleich zu den mtBPL-Mäusen (Abbildung 29 A). In den Hepatozyten der mtBPL-Mäuse wurde im Altersverlauf bis 12 Monate ein gleichbleibendes ATP / Protein-Verhältnis ermittelt. Das ADP /Protein-Verhältnis in den Hepatozyten der Kontrollmäusen war im Alter von 3 und 6 Monaten signifikant höher als bei den mtBPL-Mäusen, bei denen das ADP /Protein-Verhältnis im Alter von 9 Monaten signifikant erhöht war (Abbildung 29 B). Die Summe vom ATP- und ADP-Gehalt in Hepatozyten des Kontrollmausstammes war in den ersten 6 Lebensmonaten wesentlich höher als zu den späteren Alterszeitpunkten (9 und 12 Monate), während sich der Gesamtgehalt von ATP und ADP in mtBPL-Mäusen im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten kaum veränderte (Abbildung 29 C). Da der ADP-Gehalt der mtBPL-Mäuse zum Zeitpunkt 9 Monate zunahm und eine gleichzeitige Abnahme des ATP-Gehaltes erfolgte, ergab sich ein signifikant niedrigeres ATP / ADP-Verhältnis in den Hepatozyten der mtBPL-Mäuse verglichen mit dem Kontrollmausstamm (Abbildung 29 D).

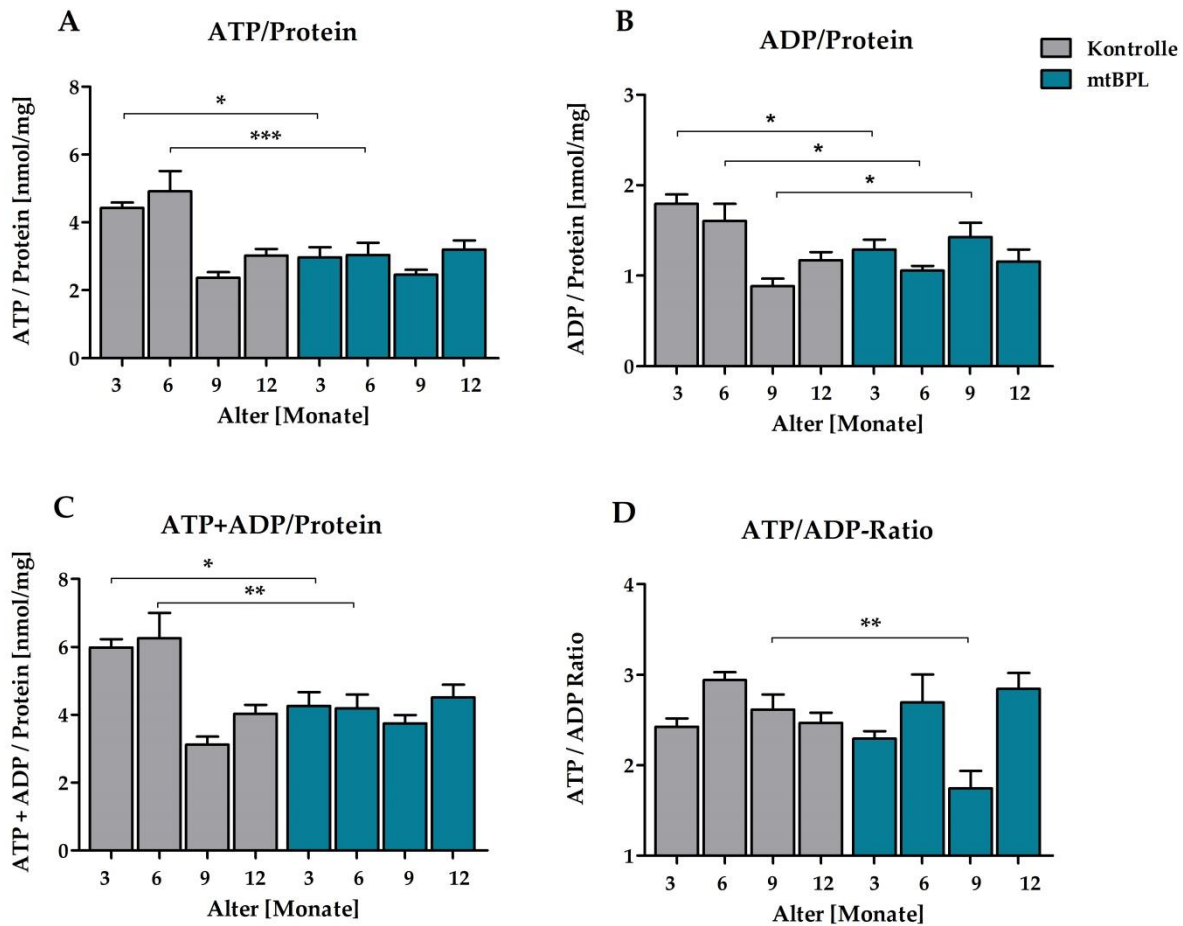


Abbildung 29: ATP- und ADP-Gehalt in isolierten Hepatozyten. Die Säulendiagramme zeigen die altersabhängigen Verhältnisse von ATP zu Protein (A), ADP zu Protein (B), ATP + ADP zu Protein (C) und ATP zu ADP (D) der Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen). (n = 8-9 pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.7 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber

Die altersabhängige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde in der Leber des Kontroll- und des mtBPL-Mausstammes untersucht.

In beiden Mausstämmen zeigte sich eine altersabhängige Erhöhung der ROS-Produktion in der Leber vom 3. zum 12. Lebensmonat (Abbildung 30). Bis zum 9. Lebensmonat der Mäuse nahm die ROS-Produktion in beiden Mausstämmen gleich stark zu. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen steigerte sich die ROS-Produktion vom 9. zum 12. Lebensmonat in den mtBPL-Mäusen um mehr

als das Doppelte und war somit signifikant erhöht (9 Monate: 0,15 % vs. 12 Monate: 0,34 %) (Abbildung 30 B).

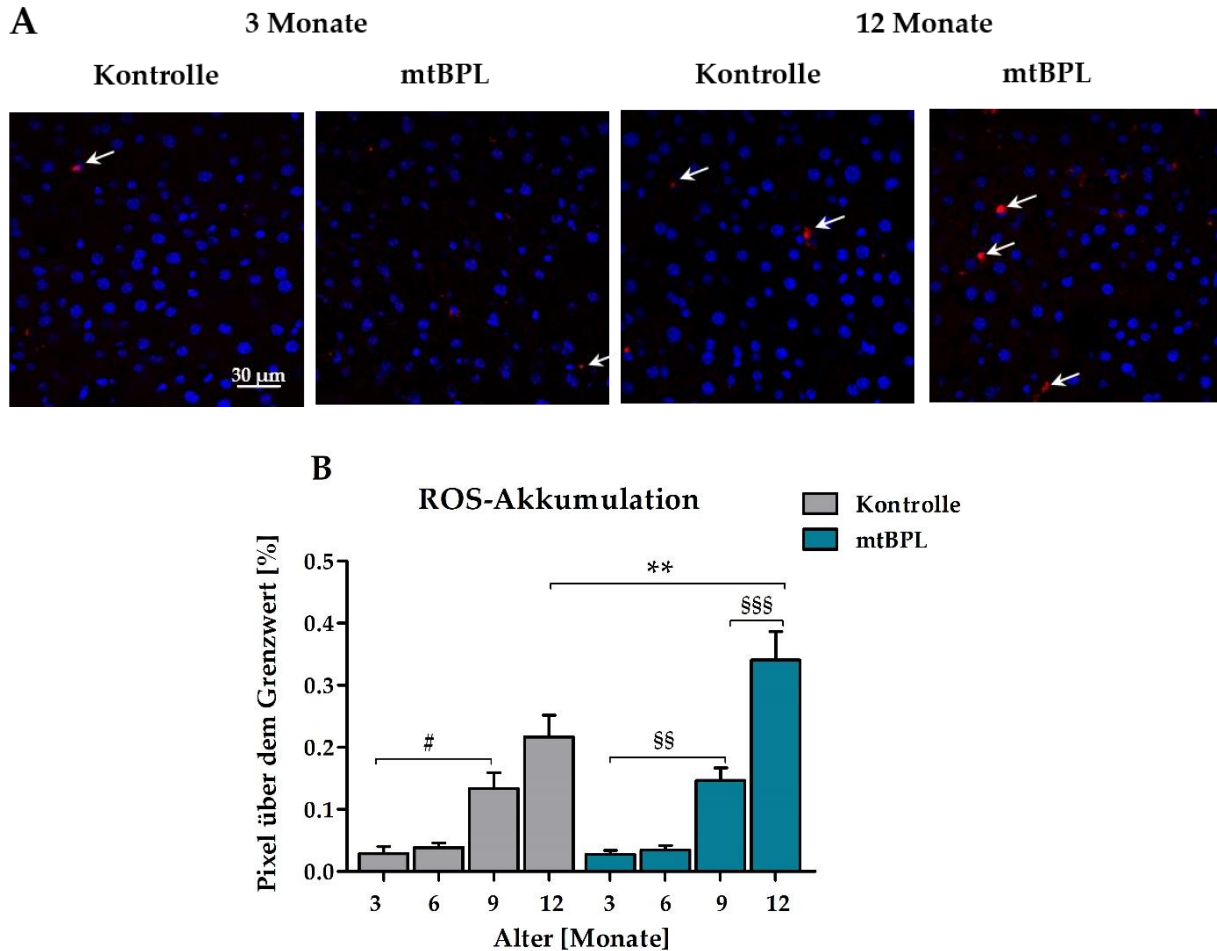


Abbildung 30: Analyse reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber. (A) Beispielbilder von Leberschnitten der Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen) im Alter von 3 und 12 Monaten. Die mit MitoSox® gefärbten Leberschnitte wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die rot fluoreszierenden Spots (weiße Pfeile) entsprechen akkumulierter reaktiver Sauerstoffspezies. In blau sind die mit DAPI gefärbten Zellkerne dargestellt. (B) Quantitative Auswertung der ROS-Akkumulation im Lebergewebe von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen). (n=5 Bilder von 4 - 6 Mäusen pro Zeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM; # p<0,05, **, §§ p<0,01; §§§ p<0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.8 Expression antioxidativer Enzyme

Zur Analyse antioxidativer Enzyme im Lebergewebe wurde die Expression von Katalase (*CAT*), Superoxiddismutase 1 und 2 (*SOD1*, *SOD2*), Glutathionperoxidase 1 (*GPX*), Peroxiredoxin 3 (*PRDX 3*) und des Entkopplungsprotein 2 (*UCP2*) auf mRNA-Ebene untersucht. Zusätzlich wurde

die Expression der Enzyme Katalase und SOD 2 mit Hilfe von Western Blots auf Proteinebene untersucht.

3.8.1 Genexpression antioxidativer Enzyme in der Leber

Das altersabhängige Genexpressionsmuster der zytosolischen, antioxidativen Enzyme Katalase (*CAT*) und Superoxiddismutase 1 (*SOD1*) war im Kontrollmausstamm vergleichbar. Bis zum 9. Lebensmonat stieg die Genexpression der Enzyme *CAT* und *SOD1* um 18 – 35 % an, während diese zum Alter von 12 Monaten um circa 35 % sank (Abbildung 31 A und B). Im Vergleich zum Kontrollmausstamm zeigten die mtBPL-Mäuse keine altersabhängige Veränderung der Genexpression der Katalase. Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeigte sich eine 75%ige Genexpressionsrate (Abbildung 31 A). Die relative *SOD1*-Genexpressionsrate der mtBPL-Mäuse betrug im Alter von 3 Monaten 75 % im Vergleich zu den 3 Monate alten Kontrollmäusen und nahm im Altersverlauf bis 12 Monate nochmal um 23 % ab.

Die mitochondrial lokalisierte Superoxiddismutase 2 (*SOD2*) zeigte im Kontrollmausstamm eine Zunahme der Genexpression im Alter von 6 Monaten um 20 % bezogen auf die Genexpression der 3 Monate alten Mäuse. Im weiteren Lebensverlauf der Kontrollmäuse blieb die *SOD2*-Genexpressionsrate konstant. Im Vergleich zu den 3 Monate alten Kontrollmäusen betrug die Genexpressionsrate der *SOD2* der mtBPL-Mäuse bis zum 9. Lebensmonat 85 % und sank schließlich auf 74 % im Alter von 12 Monaten.

Die zelluläre Glutathionperoxidase 1 (*GPXI*) und das mitochondrial lokalisierte Peroxiredoxin 3 (*PRDX3*) waren im gesamten Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten in mtBPL-Mäusen signifikant niedriger exprimiert im Vergleich zum Kontrollmausstamm (Abbildung 31 D und E). Im Alter von 3 Monaten zeigten die mtBPL-Mäuse eine *GPXI*-Genexpression von 50 %, welche im Alter von 12 Monaten nur noch 14 % betrug. Die Genexpression des Peroxiredoxin 3 der mtBPL-Mäuse lag zum 3 Monatszeitpunkt bei 86 % und sank bis zum 12 Monatszeitpunkt auf 46 %.

Im Kontrollmausstamm zeigte sich für die Expression von *UCP 2* ein ähnliches altersabhängiges Genexpressionsmuster wie für *Katalase*, *SOD 1*; *GPX 1* und *PRDX 3*. Die Expression nahm bis zum Zeitpunkt 9 Monate zu, fiel aber im Alter von 12 Monaten wieder auf den 3-Monatszeitpunkt ab. Im Vergleich dazu lag das Maximum der *UCP 2*-Genexpression in mtBPL-Mäusen im Alter von 6 Monaten vor und sank dann wieder, wobei die Expression zu allen Zeitpunkten unter der des Kontrollstammes lag.

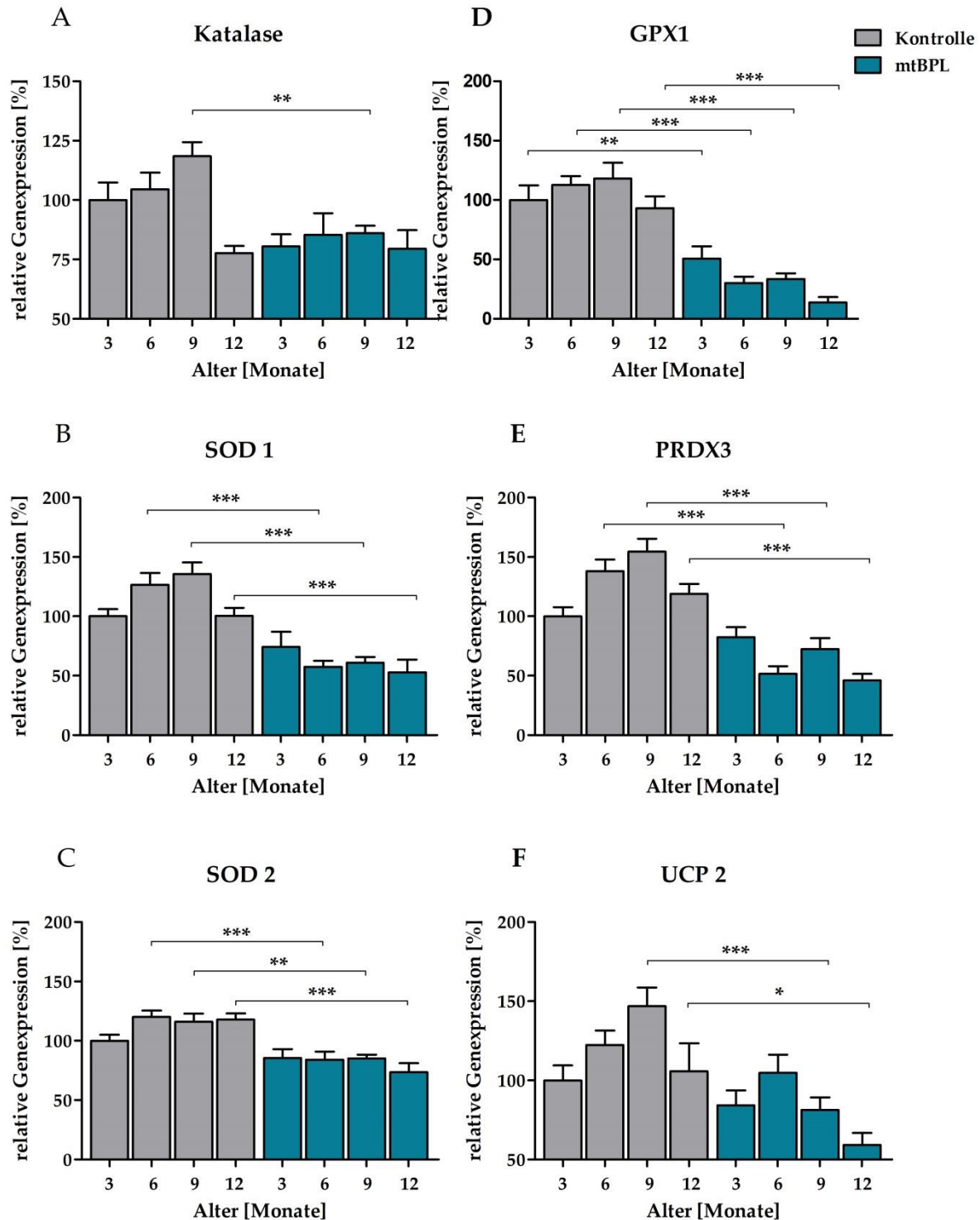


Abbildung 31: Altersabhängige Genexpressionsmuster antioxidativer Enzyme in der Leber. Es wurde die relative, altersabhängige Genexpression von *CAT* (A), *SOD1* (B), *SOD2* (C), *GPX1* (D), *PRDX3* (E) und *UCP2* (F) im Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mausstamm (blaue Säulen) ermittelt. Die relative Genexpression wurde jeweils zu *GAPDH* normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.8.2 Proteinexpression von SOD2 und Katalase in der Leber

Die Proteinexpression der Katalase in der Leber zeigte in beiden Mausstämmen ein ähnliches Expressionsmuster (Abbildung 32 A). Bis zum Alter von 6 Monaten stieg die relative Proteinexpression der Katalase im Kontrollmausstamm auf 146 % und im mtBPL-Mausstamm auf 110 % an und fiel anschließend im Alter von 9 Monaten auf 65 % in den Kontrollmäusen und auf 55 % in den mtBPL-Mäusen ab. Im mtBPL-Mausstamm konnte im Alter von 12 Monaten ein erneuter Expressionsanstieg der Katalase auf 75 % ermittelt werden.

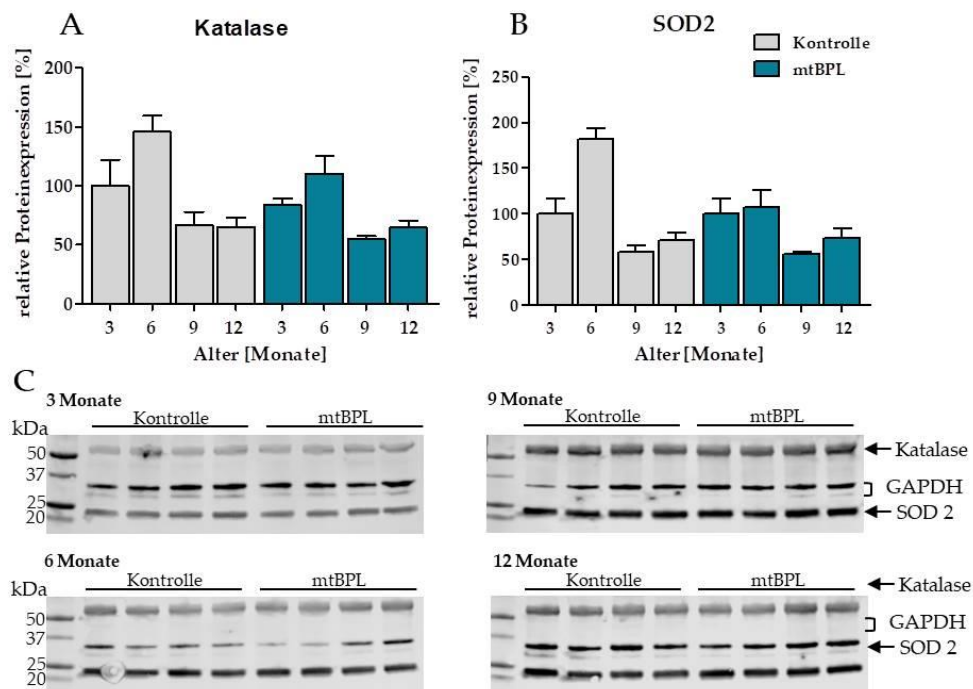


Abbildung 32: Altersabhängige Proteinexpression von Katalase und SOD2 in der Leber. Es wurde die relative, altersabhängige Proteinexpression von Katalase (A) und SOD2 (B) im Lebergewebe vom Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mausstamm (blaue Säulen) ermittelt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blots (C) zu den Alterszeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monaten. Es wurden pro Alterszeitpunkt und Mausstamm je 2 Männchen und je 2 Weibchen untersucht. Die relative Proteinexpressionsanalyse wurde jeweils zur GAPDH-Menge normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 4 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur

Die Analyse der SOD 2-Proteinexpression im Lebergewebe beider Mausstämmen zeigte ein mit der Katalase vergleichbares Expressionsmuster (Abbildung 32 B). Im Kontrollmausstamm konnte im Alter von 6 Monaten ein höherer Expressionsanstieg als im mtBPL-Mausstamm gezeigt werden. Im Alter von 9 Monaten war die Proteinexpression der SOD 2 in den Kontrollmäusen auf 58 %

und in den mtBPL-Mäusen, wie auch bei der Katalase, auf 55 % gesunken. Im Alter von 12 Monaten stieg die SOD 2-Expression im mtBPL-Mausstamm wieder auf 73 % an.

3.9 mtDNA-Kopienzahl und mitochondrialer Transkriptionsfaktor A in der Leber

Um eine Aussage zur mitochondrialen Masse machen zu können, wurde die mtDNA-Kopienzahl bestimmt. Die altersabhängige Expression von *TFAM* wurde auf mRNA-Ebene ermittelt.

Im Kontrollmausstamm zeigte sich vom 3. zum 6. Lebensmonat eine 75 %ige Zunahme der mtDNA-Kopienzahl (Abbildung 33 A). Im Vergleich zum Kontrollmausstamm konnte in 3 Monate alten mtBPL-Mäusen eine mtDNA-Kopienzahl von 74 % nachgewiesen werden, welche sich im Altersverlauf bis 12 Monate auf 83 % erhöht. Im Alter von 6 und 12 Monaten zeigten die mtBPL-Mäuse somit eine signifikant niedrigere mtDNA-Kopienzahl als die Kontrollmäuse. Um die mtDNA-Kopienzahl besser beurteilen zu können, wurde die relative Genexpression von *TFAM* ermittelt (Abbildung 33 B). Zu allen Alterszeitpunkten war die *TFAM*-Genexpressionsrate der Kontrollmäuse signifikant höher als in den mtBPL-Mäusen. In beiden Mausstämmen konnte das höchste Genexpressionsniveau im Alter von 9 Monaten nachgewiesen werden. Die mtBPL-Mäuse zeigten im Alter von 3 Monaten ein Genexpressionslevel von nur 39 %, welches bis zum 9. Lebensmonat auf 47 % anstieg und im Alter von 12 Monaten wieder auf 35 % abfiel.

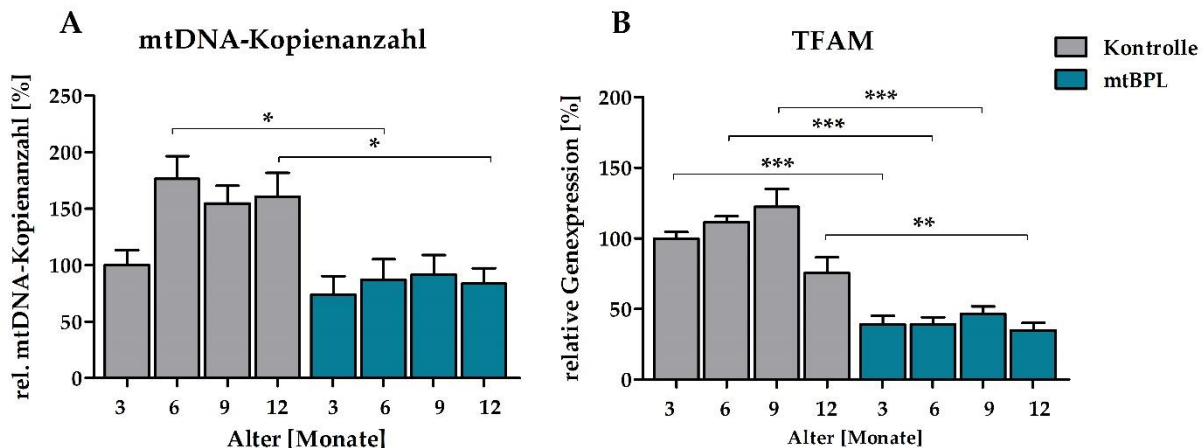


Abbildung 33: Die mtDNA Kopienzahl und die relative *TFAM* Genexpressionsrate in der Leber. (A) Ermittelt wurden die relative mtDNA Kopienzahl (n = 5-12) und (B) die relative *TFAM* Genexpressionsrate (n = 8-10) im Lebergewebe von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) zu den Alterszeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monaten. Die relative Genexpressionsanalyse wurde zur GAPDH-Menge normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (Mittelwert in % \pm SEM: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.10 Genexpression von Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette

Da sich eine der zwei Mutationen des untersuchten mtBPL-Mausstammes in der Untereinheit ND5 des Komplexes I der Atmungskette befindet, wurde die Genexpression von *ND5* und weiteren mitochondrial und nukleär-kodierten Untereinheiten untersucht.

Die Genexpressionen der mitochondrial-kodierten Untereinheiten von Komplex I der Atmungskette *ND2* und *ND5/ND6* (Abbildung 34 A und B) zeigten in der Leber des mtBPL-Mausstammes einen Expressionsanstieg im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten. In den mtBPL-Mäusen konnte im Alter von 12 Monaten eine *ND2*-Genexpression von 300 % und eine *ND5/ND6*-Genexpression von etwa 250 % gemessen werden. Das Genexpressionsmuster der *ND2* war in den Kontrollmäuse zu allen untersuchten Alterszeitpunkten konstant (Abbildung 34 A), während die Expressionsrate von *ND5/ND6* im Altersverlauf abnahm (Abbildung 34 B). Somit zeigten die mtBPL-Mäuse eine signifikant erhöhte Genexpression von *ND2* und *ND5/ND6* im Alter von 6 bis 12 Monaten.

Die untersuchten, nukleär-kodierten Gene *NDUFB 4*, *NDUFB 8* und *NDUFA 11* zeigten im Kontrollmausstamm eine konstante Genexpression im Altersverlauf.

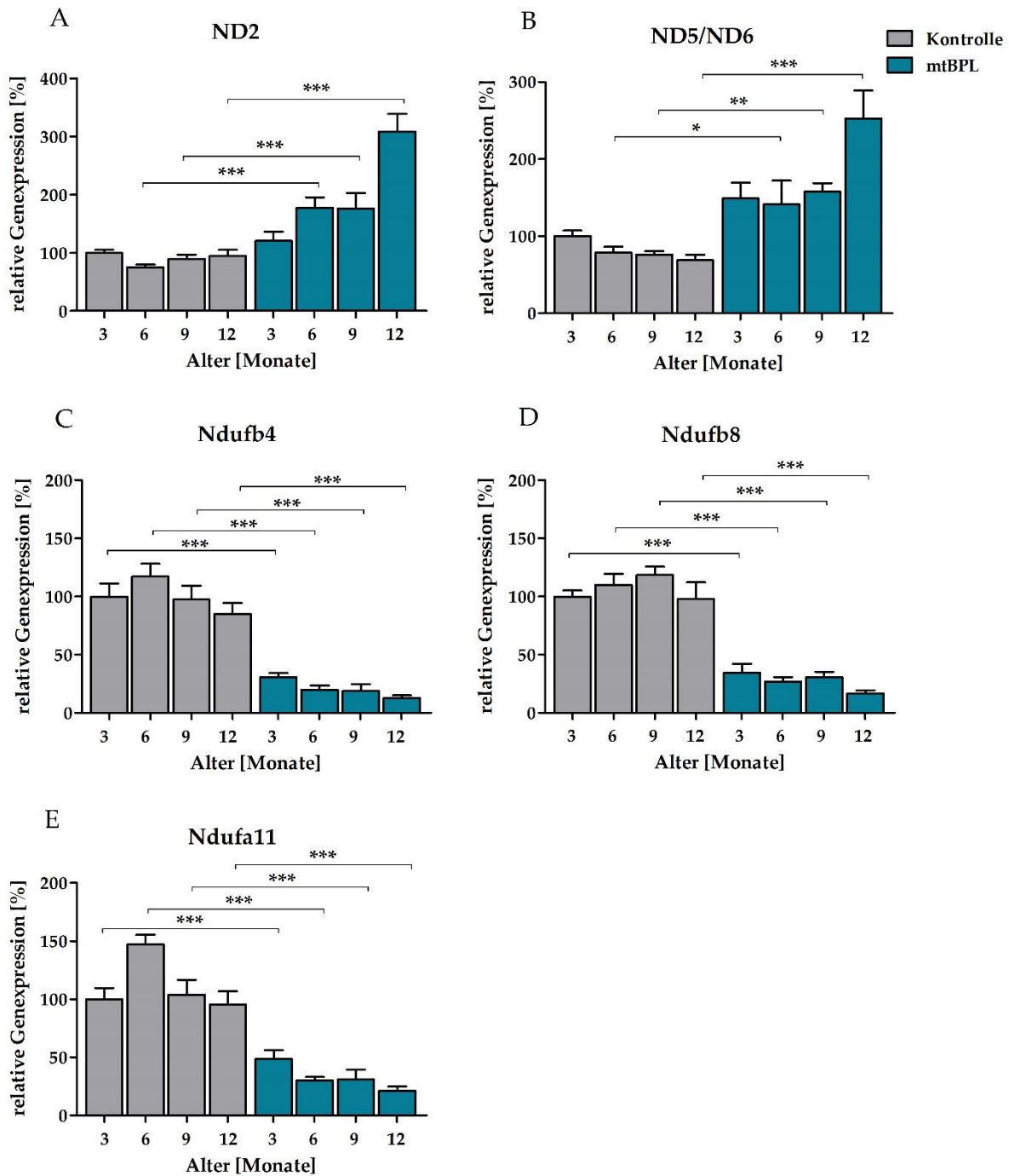


Abbildung 34: Altersabhängige Genexpressionsmuster von Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette in der Leber. Es wurde die relative, altersabhängige Genexpression von ND2 (A), ND5/ND6 (B), NDUFB 4 (C), NDUFB 8 (D) und NDUFA 11 (E) des Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mausstammes (blaue Säulen) dargestellt. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu *MT-RNR 2* bei den mitochondrial codierten Genen (A, B) und zu *GAPDH* (C-E) bei den nukleär codierten Genen normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM; * p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

Wobei die *NDUFA 11*-Genexpression (Abbildung 34 E) im Alter von 6 Monaten auf 150 % anstieg und später wieder auf den Anfangswert fiel. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen zeigte sich bei den mtBPL-Mäusen mit steigendem Alter eine signifikant niedrigere und weiter sinkende Genexpression aller untersuchten, nukleär-kodierten Gene (Abbildung 34 C-E) (*NDUFB 4*: 3 Monate: 30 %, 12 Monate: 12 %; *NDUFB 8*: 3 Monate: 35 %, 12 Monate: 16 %; *NDUFA 11*: 3 Monate: 48 %, 12 Monate: 21 %).

3.11 Genexpression von Untereinheiten des Komplex IV der Atmungskette

Die zweite Mutation des untersuchten mtBPL-Mausstammes befindet sich in der Untereinheit COX 3 des Komplexes IV der Atmungskette, welche ebenfalls auf mRNA-Ebene untersucht wurde. Zusätzlich wurden weitere mitochondrial aber auch nukleär-kodierte Gene für Untereinheiten des Komplexes IV der Atmungskette untersucht. In Abbildung 35 A und B ist die Genexpression der mitochondrial-kodierten Gene *COX 1* und *COX 3* für die Untereinheiten 1 und 3 der Cytochrom-c-Oxidase dargestellt. Die Analyse der Genexpressionen von *COX 1* im Lebergewebe des Kontrollmausstammes zeigte eine relativ konstante Expressionsrate, mit Ausnahme des 6 Monatszeitpunktes, an dem die Expression auf 130 % anstieg (Abbildung 35 A). Im Lebergewebe der mtBPL-Mäuse wurde zum 3-Monatszeitpunkt eine Genexpressionsrate der *COX 1* von 140 % gemessen, welche im Alter von 6 Monaten auf 235 % anstieg. Im Alter von 9 Monaten nahm diese Genexpression wieder ab und war dann aber in 12 Monate alten Mäusen wieder auf das Niveau von 6 Monaten gestiegen. Die Expression der *COX 1* war in den mtBPL-Mäusen zu allen Zeitpunkten erhöht. Somit konnte im Alter von 6 bis 12 Monaten in den mtBPL-Mäusen verglichen mit den Kontrollmäusen eine signifikant höhere *COX 1*-Genexpressionsrate nachgewiesen werden. Auch die Genexpressionsrate der *COX 3* war in den mtBPL-Mäusen zu allen gemessenen Alterszeitpunkten gegenüber den Kontrollmäusen erhöht (Abbildung 35 B). Da die *COX 3*-Expression in der Leber von Kontrollmäusen im Alter sank, im Gegensatz dazu aber in den mtBPL-Mäusen anstieg, ergab sich für den 12 Monatszeitpunkt eine signifikant erhöhte Genexpression im mtBPL-Mausstamm (Kontrolle: 61 % vs. mtBPL: 130 %).

Anders als die mitochondrial-kodierten Gene wurden die nukleär-kodierten Gene *COX5a*, *COX6a1*, *COX6b1* und *COX7a2* im Lebergewebe der mtBPL-Mäuse zu allen untersuchten Alterszeitpunkten von 3 bis 12 Monaten signifikant niedriger exprimiert als in den Kontrollmäusen (Abbildung 35 C-F).

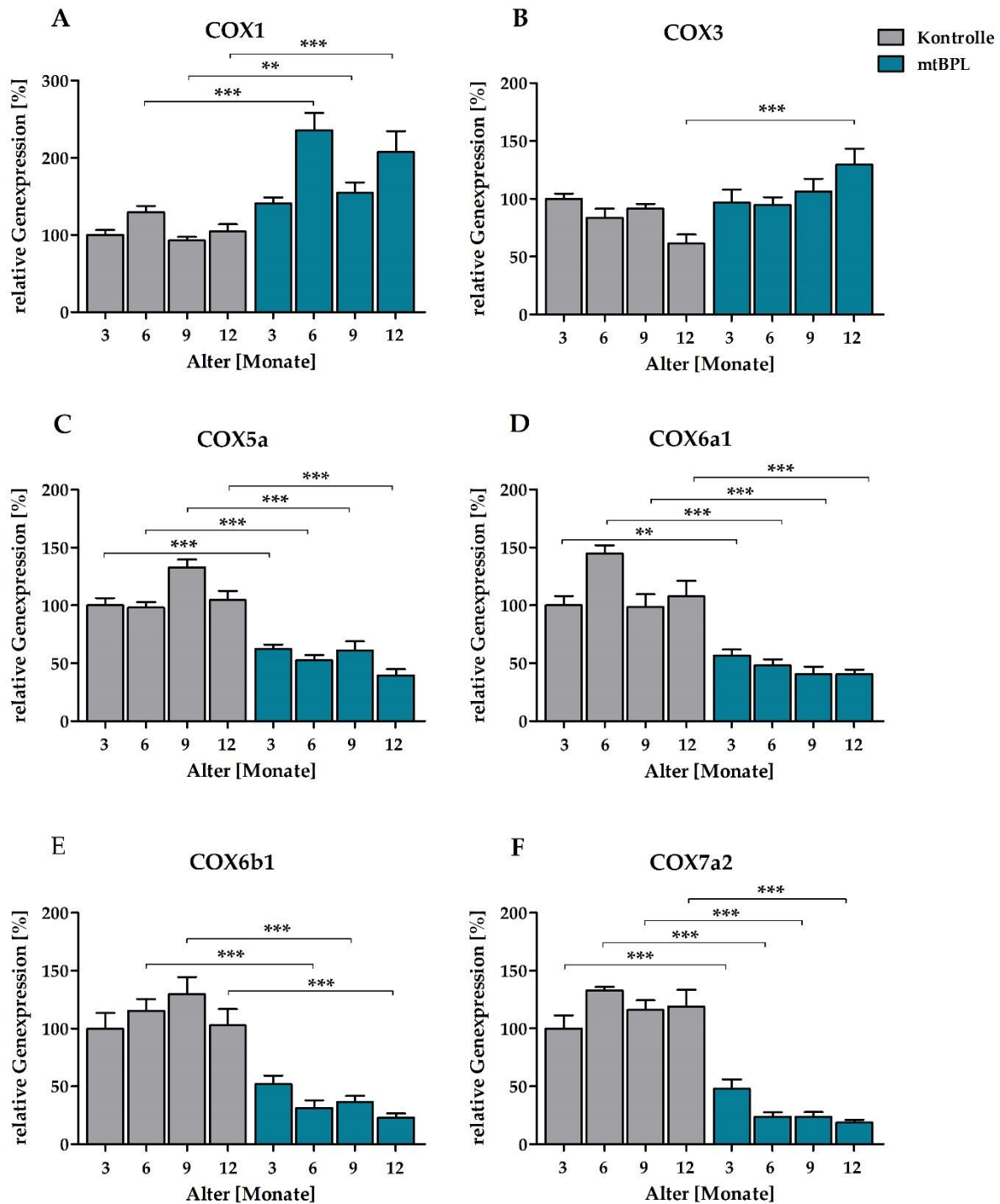


Abbildung 35: Altersabhängige Genexpression von Untereinheiten des Komplex IV der Atmungskette in der Leber. Es wurde die relative, altersabhängige Genexpression von *COX1* (A), *COX3* (B), *COX5a* (C), *COX6a1* (D), *COX6b1* (E) und *COX7a2* (F) des Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mausstammes (blaue Säulen) dargestellt. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu *MT-RNR2* bei den mitochondrial-kodierten Genen (A, B) und zu *GAPDH* bei den nukleär-kodierten Genen (C-F) normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM; ** p < 0,01; *** p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

Die Genexpression dieser vier untersuchten Gene war im Alter von 3 Monaten bei den mtBPL-Mäusen um rund 50 % reduziert. Im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten nahm die Expression aller untersuchten nukleär-kodierten Gene in mtBPL-Mäusen weiter ab.

3.12 Mitochondriale Dynamik - Fusion und Teilung

Für die Untersuchung der mitochondrialen Dynamik, welche durch Fusions- und Teilungsprozesse charakterisiert ist, wurde im Lebergewebe der Mäuse zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten Genexpressionsanalysen der verantwortlichen Proteine durchgeführt. Hierfür wurden die Fusionsproteine *OPA1*, *MFN1* und *MFN2* sowie die Teilungsproteine *DNM1L*, *MFF* und *FIS1* untersucht.

3.12.1 Genexpression mitochondrialer Fusionsproteine

Die Expression des *MFN1* in der Leber der Kontrollmäuse zeigte bis zum 9. Lebensmonat einen signifikanten Anstieg auf 170 % (Abbildung 36 A), die aber im Alter von 12 Monaten wieder auf 144 % sank. Verglichen mit dem Kontrollmausstamm konnte im mtBPL-Mausstamm eine eher konstante Genexpression des *MFN1*-Gens im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten nachgewiesen werden, die an den Zeitpunkten 6, 9 und 12 Monaten niedriger als im Kontrollmausstamm war. Die Genexpression von *MFN2* (Abbildung 36 B) und *OPA1* (Abbildung 36 C) in den Kontrollmäusen zeigte ein ähnliches Genexpressionsmuster im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten. Im Alter von 6 und 12 Monaten waren die beiden Gene in den Kontrollmäusen etwas niedriger exprimiert als im Alter von 3 und 9 Monaten. Die mtBPL-Mäuse zeigten einen *MFN2*-Genexpressionsanstieg ab dem 6. Lebensmonat auf 117 % im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die *OPA1*-Genexpression der mtBPL-Mäuse war im Alter von 6 Monaten signifikant erhöht, während sich diese Genexpression bei den Alterszeitpunkten 3, 9 und 12 Monate mit der der Kontrollmäuse glich.

Nachdem die Genexpressionsraten der untersuchten Fusionsproteine zusammengefasst wurden (Abbildung 36 D), zeigte sich weder ein Unterschied zwischen den Zeitpunkten noch zwischen den zwei untersuchten Mausstämmen.

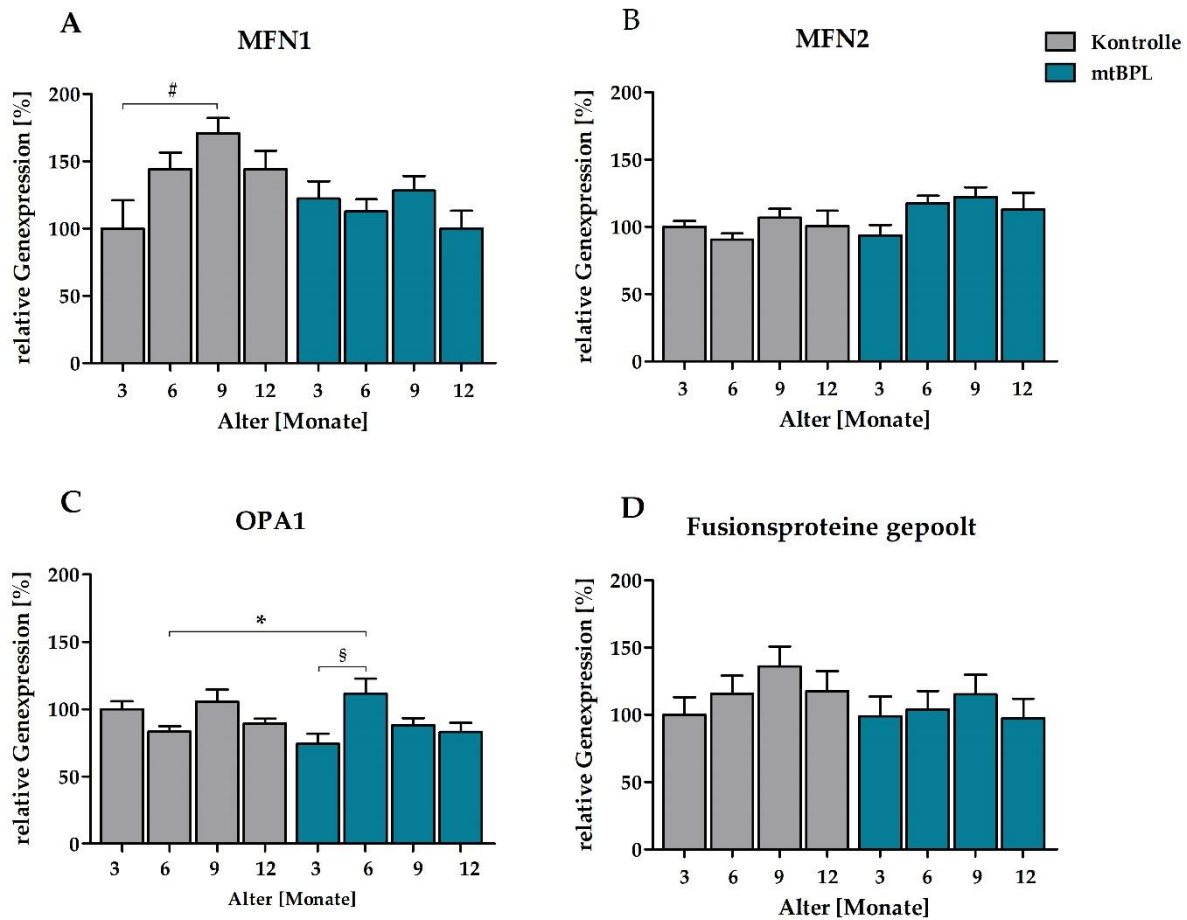


Abbildung 36: Genexpressionsanalyse mitochondrialer Fusionsproteine im Lebergewebe. Es wurde die relative, altersabhängige Genexpression von *MFN1* (A), *MFN2* (B), *OPA1* (C) und von den gepoolten Fusionsproteinen (D) von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monaten dargestellt. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; *, \$, # p < 0,05; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

3.12.2 Genexpression mitochondrialer Teilungsproteine in der Leber

Die Genexpressionsanalyse der untersuchten mitochondrialen Teilungsproteine *FIS 1*, *DNM1L* und *MFF* zeigte im mtBPL-Mausstamm eine geringere Genexpressionsrate im Vergleich zum Kontrollmausstamm (Abbildung 37). Die Kontrollmäuse wiesen bis 9 Monate einen altersabhängigen Anstieg der *FIS 1*-Genexpression auf, welche allerdings im Alter von 12 Monaten wieder auf den Ausgangswert (3 Monate) zurückging (Abbildung 37 A). Die mtBPL-Mäuse hingegen wiesen eine altersabhängig, signifikant abnehmende Genexpression von *FIS 1* auf

(3 Monate: 48 % und 12 Monate 20 %) (Abbildung 37 A). Das Genexpressionsmuster von *DNM1L* zeigte für den mtBPL-Mausstamm eine steigende Expression im Altersverlauf von 3 Monate bis 12 Monate (Abbildung 37 B). Im Alter von 3 Monaten betrug die *DNM1L*-Genexpression der mtBPL-Mäuse 64 %, welche bis zum Zeitpunkt von 12 Monaten auf 84 % anstieg. Die *MFF*-Genexpression beider Mausstämme war der des *FIS1* ähnlich. Der Maximalwert der *MFF*-Genexpressionsrate konnte im Kontrollmausstamm im Alter von 12 Monaten mit circa 200 % nachgewiesen werden, während der mtBPL-Mausstamm im Alter von 3 Monaten eine maximale *MFF*-Genexpressionsrate von 65 % und im Alter von 12 Monaten eine Genexpressionsrate von 36 % aufwies (Abbildung 37 B).

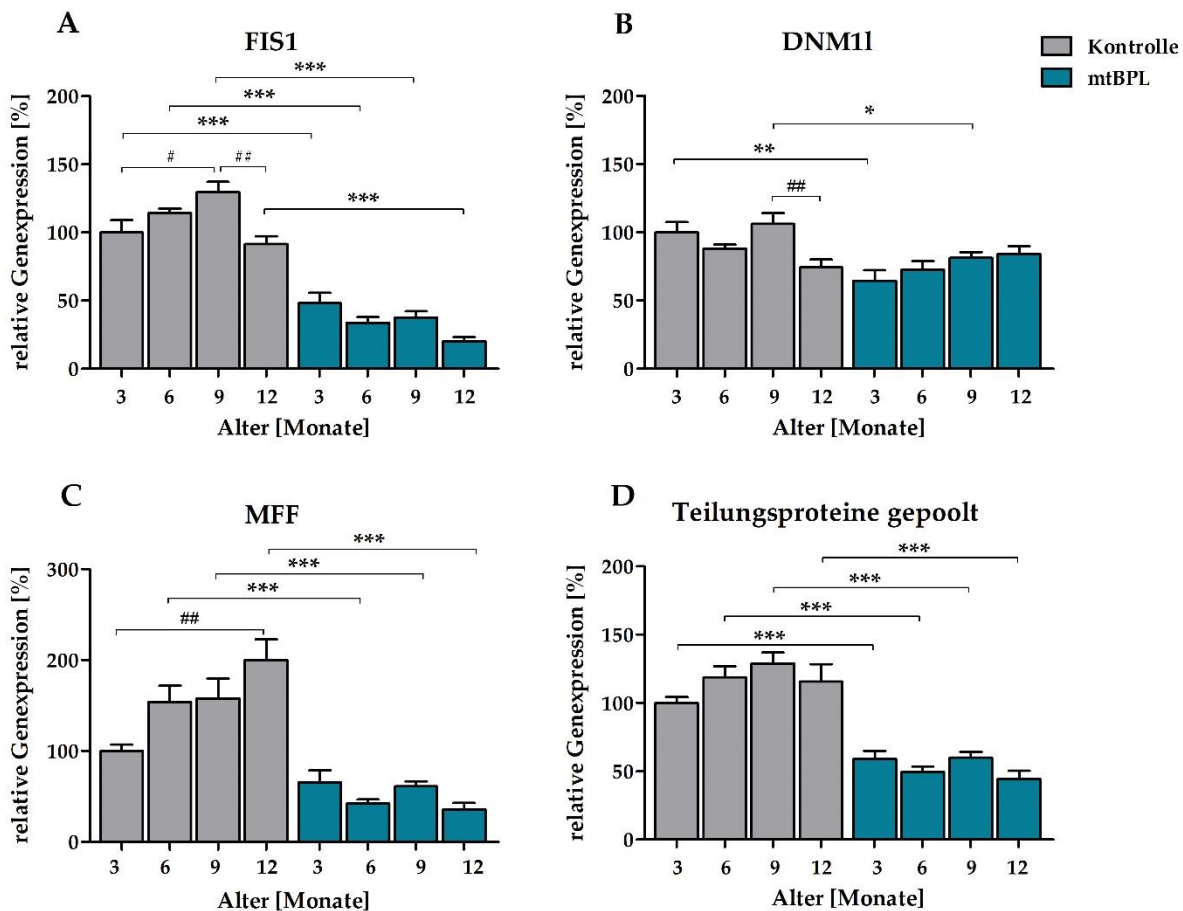


Abbildung 37: Genexpressionsanalyse mitochondrialer Teilungsproteine im Lebergewebe. Die relative Genexpression von *FIS1* (A), *DNM1L* (B), *MFF* (C) und von den gepoolten Teilungsproteinen (D) von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) sind als Säulendiagramme dargestellt. Die relative Genexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 8-10 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % \pm SEM; *, # p < 0,05; **, ##, \$\$ p < 0,01; ***, p < 0,001; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

Fasst man die erhobenen Daten zur Genexpression der Teilungsproteine zusammen, so wird das verringerte Expressionsniveau dieser Proteine in der Leber des mtBPL-Mausstammes, unabhängig vom Alter der Mäuse, deutlich.

3.12.3 Proteinexpression des Teilungsproteins FIS1

Die Proteinexpression von FIS 1 (Abbildung 38) zeigte für beide Mausstämme ein ähnliches Expressionsmuster im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten wie das FIS 1-Genexpressionsmuster in Abbildung 37 A. Während die Proteinexpression von FIS 1 im Kontrollmausstamm bis zum 9-Monatszeitpunkt kontinuierlich anstieg und erst im Alter von 12 Monaten wieder abfiel, blieb die Expression im mtBPL-Mausstamm konstant.

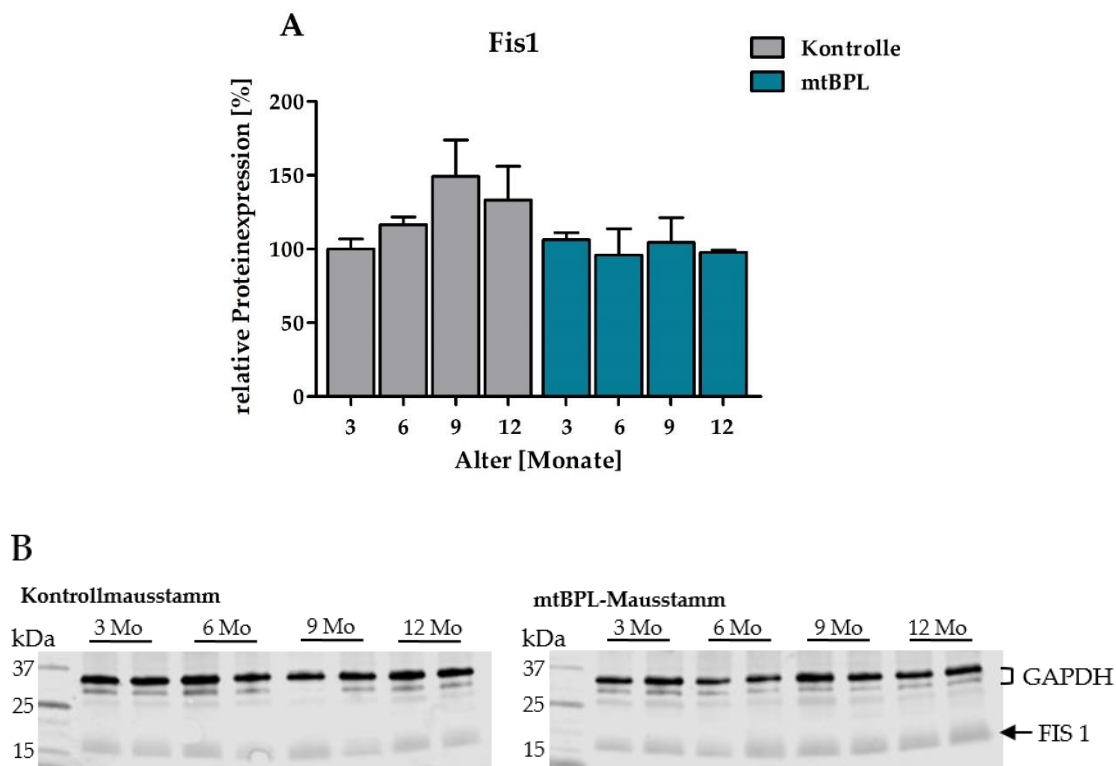


Abbildung 38: Altersabhängige Proteinexpression von FIS 1 in der Leber. Es wurde die relative, altersabhängige Proteinexpression im Lebergewebe von FIS 1 (A) von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) in einem Balkendiagramm dargestellt. Je ein Western Blot (B) ist stellvertretend für beide Mausstämme zu den Alterszeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monaten gezeigt. Es wurden pro Alterszeitpunkt und Mausstamm je 2 Männchen und je 2 Weibchen analysiert. Die relative Proteinexpressionsanalyse wurde jeweils zu GAPDH normalisiert. Per Definition wurde der Mittelwert 3 Monate alter Kontrollmäuse auf eine Expressionsrate von 100 % festgelegt (n = 4 Mäuse pro Alterszeitpunkt; Mittelwert in % ± SEM; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

3.12.4 Verhältnis von Fusions- und Teilungsproteinen

Zur weiteren Analyse wurden die zusammengefassten Genexpressionsdaten der Fusions- und Teilungsproteine (Abbildung 36 D und Abbildung 37 D) ins Verhältnis zueinander gesetzt. Da im Kontrollstamm die Genexpression zu allen Zeitpunkten gleich stark war, ergab sich der Wert 1 (Abbildung 39 A). In der Leber der mtBPL-Mäuse, wo die Expression der Teilungsproteine zu allen Zeitpunkten erniedrigt war, führte dies zu einem Genexpressionsverhältnis zwischen Fusions- und Teilungsproteinen mit Werten deutlich über 1. Das Maximum lag hier im Alter von 12 Monaten bei einem Wert von 2,3. In Abbildung 39 B wurde ein Schema mithilfe der Genexpressionsdaten der mitochondrialen Fusions- und Teilungsproteine angefertigt, welches den zu erwartenden Elongationsgrad der Mitochondrien im Lebergewebe darstellt.

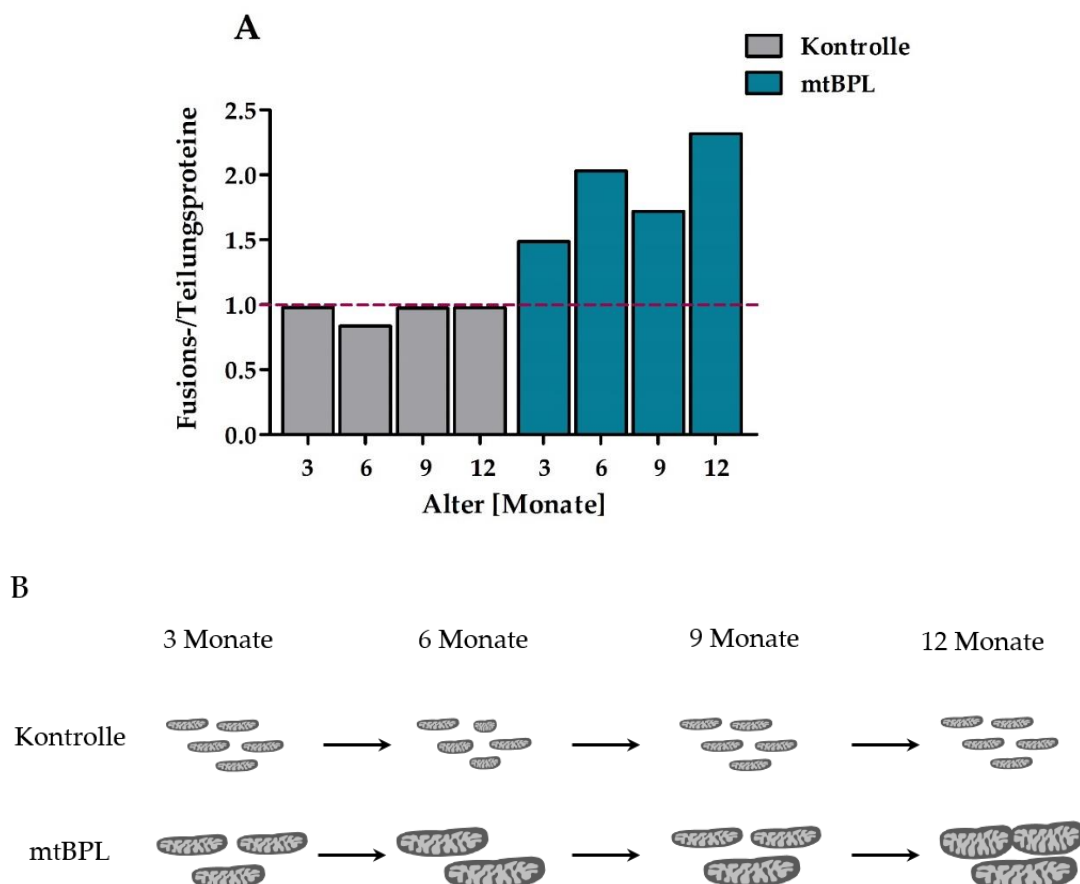
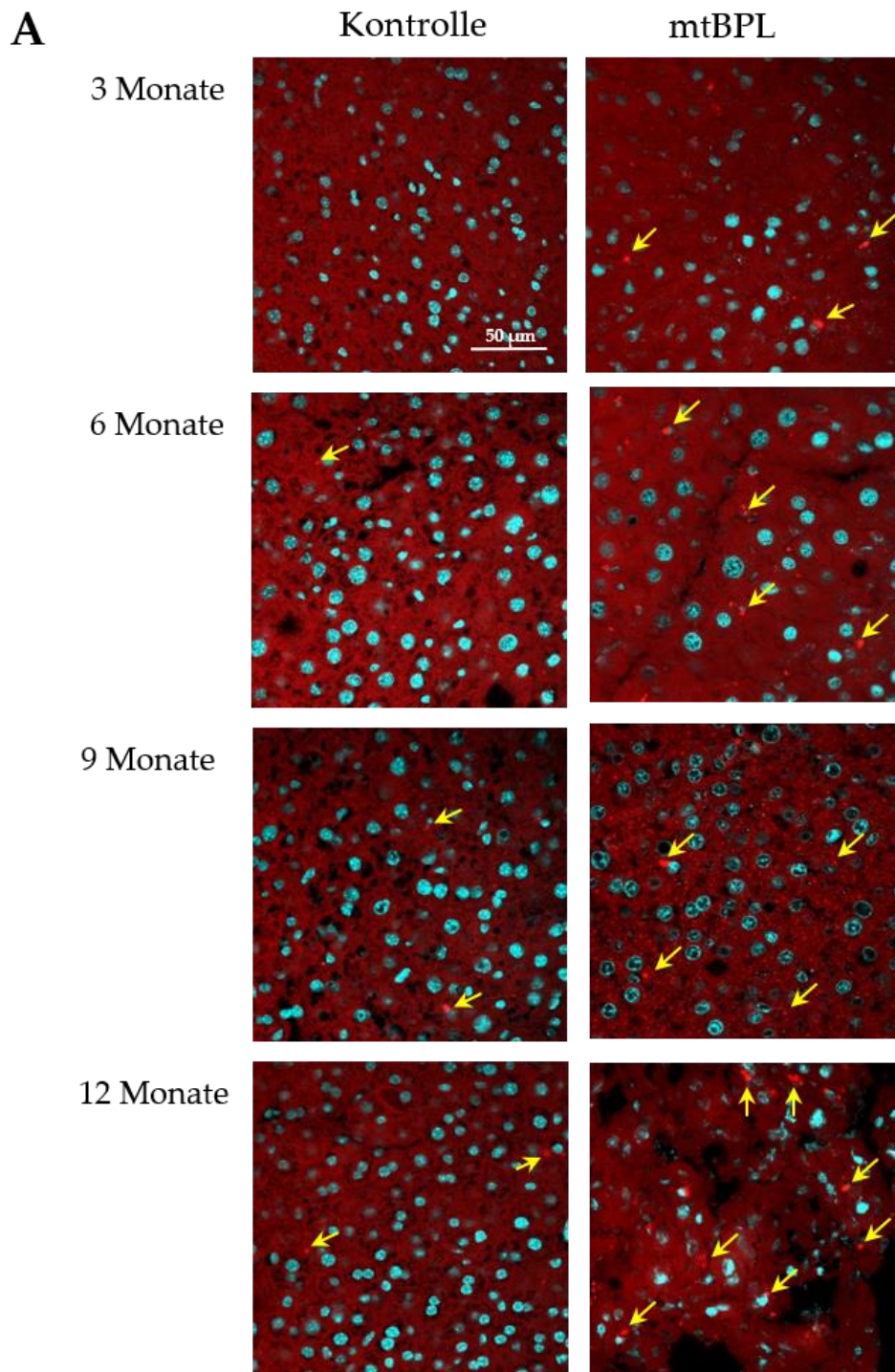


Abbildung 39: Verhältnis der Genexpressionsraten mitochondrialer Fusions- und Teilungsproteine in der Leber. (A) Dargestellt ist das Verhältnis der Genexpressionsraten von Fusions- zu Teilungsproteinen im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen). Für die Darstellung wurden die Mittelwerte der Genexpression aus Abbildung 26 D und Abbildung 37 D verwendet. (B) Aufgrund der Genexpressionsdaten erwarteter, altersabhängiger Elongationsgrad der Mitochondrien im Lebergewebe von Kontroll- und mtBPL-Mäusen im Alter von 3 bis 12 Monaten.

3.13 Mitochondriales Netzwerk

Das mitochondriale Netzwerk wurde mikroskopisch untersucht (Abbildung 40 A).



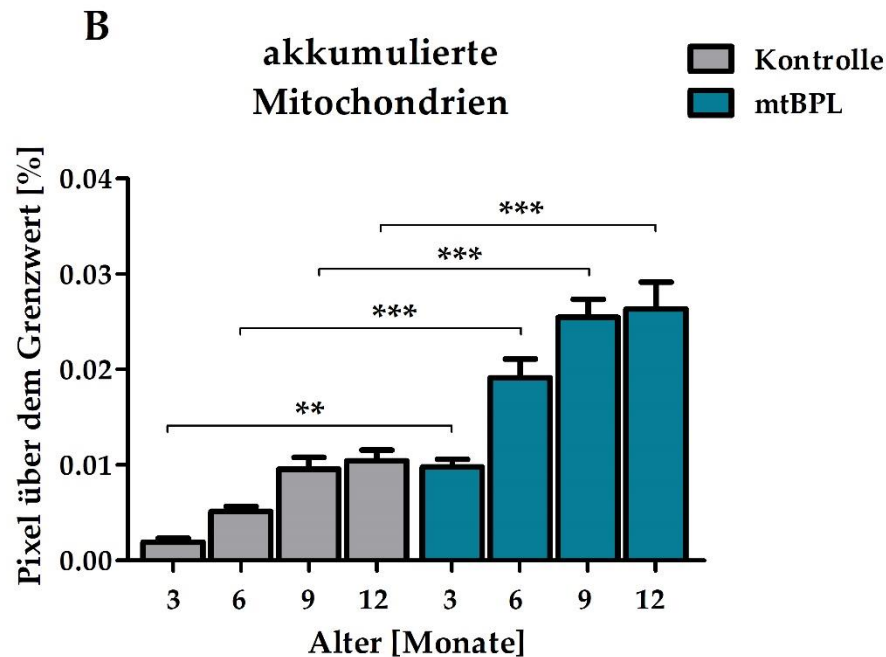


Abbildung 40: Analyse des mitochondrialen Netzwerks im Lebergewebe. (A) Beispiele fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von 3, 6, 9 und 12 Monate alter Kontroll- und mtBPL-Mäusen. Rote, stark fluoreszierende Spots (gelbe Pfeile) entsprechen akkumulierter, mitochondrialer Strukturen im Lebergewebe. (B) Quantitative Auswertung zur Bildung von akkumulierten Mitochondrien im Lebergewebe von Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäusen (blaue Säulen) wurde als Säulendiagramm dargestellt. Es wurde der prozentuale Anteil von Pixeln in den Aufnahmen mit einer Fluoreszenzintensität > 100 bestimmt. Je höher der Wert war, desto inhomogener war die mitochondriale Netzwerkstruktur im Gewebe (n=5 Bilde von 6 Mäusen; Mittelwert in % \pm SEM; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur).

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs MitoTracker® Deep Red kann das mitochondriale Netzwerk angefärbt werden. Somit konnten akkumulierte Mitochondrien visualisiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Die quantitative Auswertung erfolgte mit der AutoQuant X2 Software.

In beiden Mausstämmen zeigte sich eine altersabhängige Zunahme an akkumulierten Mitochondrien im Lebergewebe (Abbildung 40). Eine kontinuierliche mitochondriale Netzwerkstruktur ging dementsprechend mit dem Alter in beiden Stämmen teilweise verloren. Der Anteil der akkumulierten Mitochondrien in der Leber der mtBPL-Mäuse war zu allen gemessenen Alterszeitpunkten signifikant höher als in den Kontrollmäusen.

3.14 Laufleistung

Zur Untersuchung der genetisch festgelegten Laufleistung wurden untrainierte Mäuse des mtBPL- und des Kontrollmausstammes im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten auf ein Laufband gesetzt und die zurückgelegte Strecke dokumentiert. Die mtBPL-Mäuse legten im Alter von 3 Monaten fast die doppelte Strecke (Kontrollstamm: 281 m vs. mtBPL-Mäuse: 484 m) zurück als die Kontrollmäuse (Abbildung 41). Im weiteren Altersverlauf ab 6 Monaten zeigten die Mäuse beider Stämme eine vergleichbare Laufleistung, bei der es mit zunehmendem Alter zu einer geringfügigen Abnahme kam.

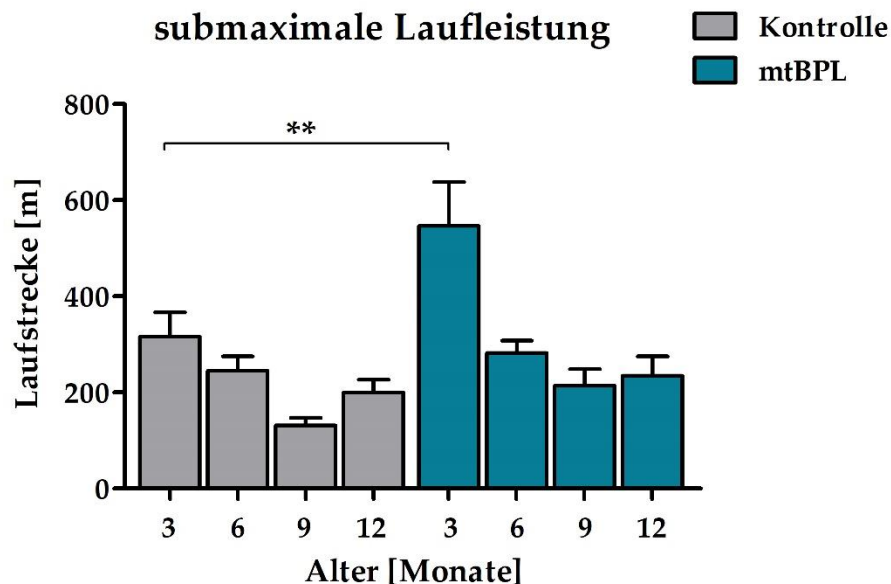


Abbildung 41: Submaximale Laufleistung von Kontroll- und mtBPL-Mäusen. Im Alter von 3, 6, 9 und 12 Monaten wurde die zurückgelegte Laufstrecke der Kontroll- (graue Säulen) und mtBPL-Mäuse (blaue Säulen) dokumentiert. Die Laufleistung der männlichen und weiblichen Mäuse wurde zusammengefasst dargestellt. (n=10-20 Mäuse pro Zeitpunkt; Mittelwert \pm SEM; *** $p < 0,001$; 1-way ANOVA/Bonferroni Korrektur)

4 Diskussion

Die mtDNA codiert im Vergleich zur nDNA nur wenige Gene, die aber für die Atmungskette essentiell sind. Schäden oder Mutationen in der mtDNA können die Ursache oder Folge einer übermäßigen ROS-Produktion sein [148], da Korrekturmechanismen fehlen. Funktionelle Strukturen in den Mitochondrien sind zudem besonders anfällig für oxidative Schäden mit der Folge einer Veränderung der biologischen Aktivität [79, 80].

In der vorliegenden Arbeit wurde der conplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mtBPL/1J, kurz mtBPL, auf altersabhängige Veränderungen in der ROS-Produktion, der mitochondrialen Struktur im Lebergewebe und im Stoffwechsel untersucht. Der mtBPL-Mausstamm zeichnet sich durch zwei Punktmutationen im mitochondrialen Genom aus, welche sich in der ND5-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes I und in der COX3-Untereinheit des Atmungskettenkomplexes IV befinden [133]. Das nukleäre Genom der Mäuse entspricht dem des Hintergrundmausstammes C57BL/6NTac. Um eine adäquate Kontrolle zu haben, wurden die Daten des mtBPL-Mausstammes mit dem ebenfalls conplastischen Kontrollmausstamm C57BL/6NTac-mt^{AKR/J}, welcher keine Mutation in der mtDNA aufweist, jedoch das gleiche nukleäre Genom besitzt, verglichen. Es wurde die Leber sowohl von männlichen als auch von weiblichen Mäusen beider Stämme im Alterungsverlauf untersucht. Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan für den Organismus. Es wurden metabolische Enzyme auf Genexpressionsebene, die Einlagerung von Fett, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Netzwerkstruktur der Mitochondrien untersucht. Zudem wurden der Respiratorische Quotient und die Fitness der Mäuse auf dem Laufband untersucht.

Besonders auffällig waren die Ergebnisse der mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die mtBPL-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikant erhöhte ROS-Akkumulation, eine doppelt so hohe Triglyceridkonzentration sowie eine deutlich vermehrte Fetteinlagerung und eine vermehrte Clusterung der Mitochondrien im Lebergewebe. Des Weiteren konnte mittels des Respiratorischen Quotienten beobachtet werden, dass die mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten einen überwiegenden Fettstoffwechsel betreiben.

4.1 Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die mitochondriale ROS-Produktion und der antioxidativen Abwehr

Die Bestimmung der mitochondrialen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies spielt eine wichtige Rolle, um die Leistung der Zelle einschätzen zu können. ROS kann sowohl physiologische Signaltransduktionswege induzieren als auch für oxidative Zellschäden verantwortlich sein. Zu den zellulären ROS gehören einerseits Radikale wie zum Beispiel das Superoxidanion (O_2^-) oder das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot) und andererseits stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Als Parameter für die ROS-Produktion im Lebergewebe der Mäuse wurde in dieser Arbeit die O_2^- -Akkumulation in den Mitochondrien ermittelt. In beiden Mausstämmen konnte in der Leber im Altersverlauf von 3 bis 12 Monaten eine ansteigende Produktion von Superoxidanionen nachgewiesen werden. Diese altersabhängige ROS-Produktion scheint einen physiologischen Mechanismus im Alterungsprozess darzustellen. Bereits 1956 beschrieb Denham Harman in seiner „Freien Radikal Theorie“ eine enge Korrelation zwischen der ROS-Generierung und dem Alterungsprozess und erklärte ROS zur Ursache des Alterns [149]. Hekimi *et al.* gehen davon aus, dass die Entstehung von ROS ein Stresssignal als Reaktion auf altersabhängige, molekulare Schäden ist, weshalb das ROS-Niveau mit dem chronologischen Alter zunimmt. Wird hierbei ein bestimmter Schwellenwert überschritten, führt ROS zu oxidativen Stress und kann aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften an gravierenden Zellschädigungen mitbeteiligt sein [150]. Dieser Schwellenwert könnte im Alter von 9 Monaten in beiden Mausstämmen erreicht worden sein, da sie zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der ROS-Akkumulation in den Mitochondrien zeigten. In den mtBPL-Mäusen verdoppelte sich der ROS-Level von 9 Monaten zu 12 Monaten im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die zum 12-Monatszeitpunkt nur einen leichten Anstieg von ROS aufwiesen. In der Arbeit von Niemann *et al.* wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg der ROS-Produktion im Alter von 9 Monaten in dem konplastischen Mausstamm C57BL6/NTac-mtNOD^{LtJ} (Abkürzung mtNOD) ermittelt. Dieser Mausstamm besitzt nur den Genpolymorphismus in der COX3-Untereinheit des Komplexes IV [142]. Allerdings stieg die ROS-Konzentration im mtNOD-Mausstamm nach 9 Monaten nicht weiter an, sank aber auch nicht trotz Gegenregulation der antioxidativen Abwehr (SOD2-Expression) im weiteren Altersverlauf wieder ab. Der enorme ROS-Anstieg in der Leber der mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten könnte aber in Zusammenhang mit der ND5-Mutation im Komplex I zu erklären sein, da die ND5-Untereinheit essenziell für die Komplex I-Aktivität

ist [40]. Verschiedene Studien belegen diesen Fakt. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im mitochondrial-kodierten ND5-Gen für Dysfunktionen der oxidativen Phosphorylierung verantwortlich sind [32, 151, 152]. Ein Genpolymorphismus in der ND5-Untereinheit steht beim Menschen im engen Zusammenhang mit Entwicklungsstörungen und einer Belastungsintoleranz [153]. Mutationen in den mitochondrial-kodierten Untereinheiten ND1 bis ND6 des Komplexes I konnten für Strukturveränderungen oder Funktionseinschränkungen ursächlich gemacht werden [154]. Die COX3-Untereinheit des Komplexes IV gehört zum katalytischen Zentrum und ist essenziell für die Stabilität des Multimers [41]. Zusammen mit den nukleären Untereinheiten COX6A1, COX6B1 und COX7A2 bildet die COX3-Untereinheit die letzte Struktureinheit, die bei der Synthese des Komplexes IV eingebaut wird [155]. Beide Mutationen könnten somit einen gestörten Elektronentransfer bewirken, was zu einer erhöhten ROS-Produktion und zu einem veränderten Stoffwechsel führt.

Die mtBPL-Mäuse sollten aufgrund der ND5-Mutation eine Aktivitätseinschränkung des Komplexes I erleiden. Um die Energiegewinnung über die Atmungskette weiterhin zu gewährleisten, kann spekuliert werden, dass der mtBPL-Mausstamm einen eingeschränkten Elektronentransfer über Komplex I durch Komplex II und alternative Seiteneinstiege für Elektronen kompensiert. Die gesteigerte Genexpression der Pyruvatcarboxylase (PCX) im Lebergewebe des mtBPL-Mausstammes, welche auf eine erhöhte Aktivität des Citratzyklus hindeutet, bestätigt diese Annahme. Dieser Kompensationsmechanismus kann einen Energieverlust ausgleichen. Durch die Dysfunktion im Elektronentransport und der somit gestörten Funktion der Atmungskette können aber Adaptationsmechanismen begünstigt werden, die sich in der Alterung negativ auswirken [156].

Physiologisch wird die ROS-Produktion durch eine komplexe antioxidative Abwehr aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien reguliert (1.5.1). In der vorliegenden Arbeit wurden die mitochondrialen antioxidativen Enzyme SOD2 und PRDX3 sowie die zytosolischen antioxidativen Enzyme Katalase, SOD1 und GPX1 im Lebergewebe der Mäuse analysiert. Die Genexpression der SOD2 im Kontrollmausstamm zeigte ab 6 Monaten einen Anstieg und blieb dann im weiteren Altersverlauf auf diesem Level. Um die mitochondriale Homöostase aufrecht zu erhalten, kann dieses Ergebnis als eine Adaptation auf die mit dem Alter zunehmende Superoxidanionen-Konzentration interpretiert werden. In der Leber der mtBPL-Mäuse wurde SOD2 zu allen gemessenen Alterszeitpunkten niedriger exprimiert als im Kontrollmausstamm. Ein ähnliches Genexpressionsmuster konnte für PRDX3 in den mtBPL-

Mäusen gezeigt werden. Während im Kontrollmausstamm die Genexpression von PRDX3 bis zum Alter von 9 Monaten anstieg und im Alter von 12 Monaten wieder abfiel, konnte in den mtBPL-Mäusen im Alter von 3 Monaten eine maximale Genexpressionsrate der PRDX3 von 86 % bestimmt werden. Auch die im Zytosol lokalisierten antioxidativen Enzyme wurden im mtBPL-Mausstamm zu allen gemessenen Alterszeitpunkten im Vergleich zum Kontrollmausstamm niedriger exprimiert. Ein weiterer antioxidativer Mechanismus kann über das uncoupling protein 2 (UCP2) erzielt werden, welches die Atmungskette entkoppelt, um so einer Erhöhung von ROS entgegenzuwirken. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die mit zunehmenden ROS-Konzentrationen in den hepatischen Mitochondrien die Genexpression von UCP2 steigerten, wurde der Entkoppler im mtBPL-Mausstamm vor allem im Alter von 3 Monaten und 12 Monaten vermindert exprimiert. Eine geringere Genexpression der oxidativen Abwehrenzyme Katalase, GPX, GSH, SOD1 und 2 konnte bereits von Floreani *et al.* in humanen Tumorzelllinien mit einer homoplasmischen Mutation im ND1-, ND4- und ND6-Gen gezeigt werden [157]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Mutation in der ND5-Untereinheit beziehungsweise die Synergie der ND5- und COX3-Punktmutation des mtBPL-Mausstammes die Genexpression von antioxidativen Enzymen und die des Entkopplers UCP2 negativ beeinflussen und eine effiziente ROS-Abwehr nicht vorliegt.

4.2 Einfluss der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die OXPHOS-Kapazität

Entlang der Atmungskettenkomplexe I bis IV wird mit Hilfe des Elektronentransports ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Die ATP-Synthase, der Komplex V, nutzt die Energie des Protonengradienten, um aus ADP und Pi ATP zu synthetisieren. Die Regeneration von ATP dient als wichtiger Parameter für einen effektiven Energiestoffwechsel und somit auch für die Mitochondrienfunktion. Die ATP/ADP-Ratio ist damit ein wichtiger physiologischer Parameter für die Zellfunktion und spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von ATP-abhängigen Enzymen und ADP-regulierten Signalproteinen [158].

Sowohl die ATP- als auch die ADP-Konzentration waren in den Kontrollmäusen in den ersten sechs Monaten signifikant höher als die der mtBPL-Mäuse. Die hohen ATP- und ADP-Konzentrationen der jungen Kontrollmäuse deuten auf einen hohen Energiestoffwechsel und eine effiziente Atmungskette während der Wachstumsphase der Mäuse hin. Im weiteren Altersverlauf der adulten Mäuse sanken beide Parameter in den isolierten Hepatozyten der Kontrolle, sodass sich

die ATP/ADP-Ratio kaum veränderte. In den Hepatozyten der mtBPL-Mäuse hingegen waren die ADP- und ATP-Konzentrationen niedrig und glichen denen der 9 und 12 Monate alten Kontrollmäuse. Für die mtBPL-Mäuse bedeutet dies eine geringere Energiebereitstellung in den ersten sechs Lebensmonaten. Das ATP/ADP-Verhältnis war bis zum Alter von 6 Monaten in beiden Mausstämmen nahezu gleich, was auf effektive Kompensationsmechanismen hinweist. Im Alter von 9 Monaten zeigten die mtBPL-Mäuse jedoch einen signifikant niedrigeren ATP/ADP-Ratio, welcher anschließend im Alter von 12 Monaten wieder anstieg. Diese Abnahme des ATP/ADP-Verhältnisses wurde allerdings durch die Abnahme von ATP und die gleichzeitige Zunahme von ADP hervorgerufen, was auf eine Funktionseinschränkung der oxidativen Phosphorylierung hindeutet. Zeitlich korreliert dies mit dem enormen Anstieg von ROS zwischen dem 6. und 9. Lebensmonat in den mtBPL-Mäusen.

4.3 ND5- und COX3-Genpolymorphismen bewirken eine verminderte mitochondriale Teilung

Mitochondrien liegen in der Zelle in einem dynamischen Netzwerk vor, welches durch ständige Fusions- und Teilungsprozesse aufrechterhalten wird. Dies spielt eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase und der physiologischen Zellfunktion. Die Funktionalität eines solchen Mitochondriennetzwerks ergibt sich aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Fusion und Teilung, welches durch die Bewegung der Mitochondrien in der Zelle erleichtert wird [159]. Ein Ungleichgewicht von Fusions- und Teilungsprozessen beeinflusst die Morphologie der Mitochondrien, welche zwischen kleinen fragmentierten und elongierten Mitochondrien stark variieren kann [60].

In dieser Arbeit wurde die Genexpression regulatorischer Fusions- und Teilungsproteine im Lebergewebe der mtBPL-Mäuse während der Alterung analysiert. Die Genexpressionsdaten der Fusionsproteine MFN 1, MFN 2 und OPA 1 sowie der Teilungsproteine FIS 1, MFF und DNM1L zeigten in der Leber der Kontrollmäuse einen leichten Anstieg bis zum Alterszeitpunkt 9 Monate. Diese Hochregulation der Fusions- und Teilungsproteine im Kontrollmausstamm korreliert mit dem altersabhängigen Anstieg der Superoxidanionen. Die Fusion von Mitochondrien dient der Zelle zunächst auch dazu, beschädigte mit gesunden Mitochondrien zu mischen. Durch nachfolgende Teilung können beschädigte Anteile in kleine Mitochondrien separiert werden, die nach der Regeneration wieder funktionsfähig in das Netzwerk eintreten können. Stark beschädigte

Mitochondrienanteile, die nicht mehr regenerieren können, werden über diesen Prozess der Mitophagie zugeführt und aus dem Netzwerk entfernt [160].

Die Genexpression der Teilungsproteine FIS 1, MFF und DNM1L sowie die Proteinexpression von FIS 1 der mtBPL-Mäuse waren in der Leber im Verlauf der Alterung stark vermindert, während die Genexpressionsanalysen der Fusionsproteine MFN 1, MFN 2 und OPA 1 vergleichbar mit den der Kontrollmäuse waren. Um eine Dysfunktion im mitochondrialen Teilungsprozess im mtBPL-Mausstamm nachzuweisen, wurde die Homogenität des Mitochondriennetzwerks im Lebergewebe untersucht. Es konnte eine altersabhängige, signifikante Zunahme von mitochondrialen Clustern beobachtet werden. Dies lässt auf eine Fehlfunktion der Dynamik der Mitochondrien und insbesondere aufgrund der eingeschränkten Teilungsfähigkeit auf morphologische Veränderungen wie eine Elongation der Mitochondrien schließen. Ein solcher Effekt konnte auch in isolierten Hepatozyten des mtNOD-Mausstamms gezeigt werden, welcher den gleichen COX3-Genpolymorphismus wie der mtBPL-Mausstamm trägt [142]. Jedoch wurde die Elongation der Mitochondrien in den mtNOD-Mäusen durch eine erhöhte Fusionsrate hervorgerufen und nicht wie in den mtBPL-Mäusen durch eine Dysfunktion der Mitochondrienteilung. Die Arbeit von Parone *et al.* zeigte, dass eine verminderte Teilungsfähigkeit von Mitochondrien zu einer verstärkten Elongation und einen Defekt der oxidativen Phosphorylierung sowie zu mtDNA-Verlusten während der Zellteilung führte [161]. So lässt sich postulieren, dass die Mitochondrien der mtBPL-Mäuse aufgrund der steigenden ROS-Spiegel und die damit verbundene Schädigung zunächst vermehrt fusionieren. Da die Teilungsprozesse nicht im gleichen Maße gesteigert werden, kommt es in der Zelle zu einer altersabhängigen Clusterbildung der Mitochondrien. Dies verhindert die Neubildung von gesunden Mitochondrien und könnte auch die beeinträchtigte Mitochondrienfunktion und somit die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies weiter verstärken.

4.4 ND5- und COX3- Genpolymorphismen beeinflussen die mitochondriale Transkription

Die Mitochondrienzahl in einer Zelle, auch als Mitochondrienmasse bezeichnet, hängt vom Gewebe, dem Zelltyp und dem Energiebedarf der Zelle ab und korreliert direkt mit der mtDNA-Kopienzahl [162]. Die Regulation der mtDNA-Kopienzahl und der Expression von mitochondrial-kodierten Genen ist in Bezug auf die Bedeutung physiologischer Prozesse und der Entstehung von Krankheiten nur wenig erforscht. Um ein normales Energieproduktionsniveau aufrechtzuerhalten,

sind sowohl eine Mindestmenge an mtDNA in einer Zelle als auch die volle Funktionsfähigkeit des mitochondrialen Genoms erforderlich [163].

Eine Knockout-Studie zeigte, dass Embryonen ohne den zentralen mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM bereits während der Schwangerschaft aufgrund mangelnder mtDNA-Kopienzahl und damit der oxidativen Phosphorylierung starben [164]. Dies zeigt die Notwendigkeit von TFAM für die mitochondriale Transkription. Daher wurden in dieser Arbeit neben der Untersuchung der mitochondrialen Dynamik auch die mtDNA-Kopienzahl und die Genexpression von TFAM im Lebergewebe im Alterungsverlauf analysiert.

Im Kontrollmausstamm wiesen die Genexpression von TFAM und die mtDNA-Kopienzahl im jungen Lebensalter (3 bis 6 Monate) der Entwicklung und dem Wachstum entsprechend einen Anstieg auf. Demgegenüber waren das Genexpressionslevel von TFAM und die mtDNA-Kopienzahl der mtBPL-Mäuse deutlich vermindert und blieben auch im Verlauf der Alterung unverändert. Wie in Absatz 4.3 diskutiert, kommt es in der Leber der mtBPL-Mäuse zu einer eingeschränkten Teilung der Mitochondrien im Alter, was ein Grund für die verminderte Replikation der mtDNA und die vermehrten Mitochondriencluster sein kann. Zusätzlich wird die Zahl der mtDNA-Kopien durch ein vermindertes Genexpressionsniveau von TFAM niedrig gehalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression sowohl mitochondrial- als auch nukleär-kodierter Gene von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe I und IV untersucht. Erstaunlicherweise war, entgegen dem aktuellen Wissensstand über TFAM und dessen essenzielle Bedeutung für die mitochondriale Transkription [15], die Genexpression der mitochondrial-kodierten Untereinheiten ND2, ND5 und ND6 des Atmungskettenkomplexes I und COX1 und COX3 des Komplexes IV im mtBPL-Mausstamm im Alterungsverlauf hochreguliert. Im Kontrollmausstamm blieb die Genexpression dieser mitochondrial-kodierten Untereinheiten im Verlauf der Alterung unverändert. Für den mtBPL-Mausstamm deutet dies auf einen TFAM-unabhängigen Mechanismus hin, welcher einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression mitochondrialer Untereinheiten der Atmungskette besitzt. In Hepatozyten von mtNOD-Mäusen bewirkte die alleinige Mutation in der COX3-Untereinheit eine erhöhte TFAM-Genexpression im Alter von 3 und 12 Monaten und eine tendenziell höhere mtDNA-Kopienzahl im Alter von 12 Monaten [142]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Anpassung der mitochondrialen Transkription im Zusammenhang mit der ND5-Mutation in Komplex I oder aber mit dem Synergismus aus beiden Mutationen im mtBPL-Mausstamm steht. Darüber hinaus konnte neben den hochregulierten mitochondrial-kodierten Genen eine Herunterregulation der nukleär-kodierten

Gene im mtBPL-Mausstamm beobachtet werden. Die gegenläufige Genexpression von Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe könnte ein Indiz für Fehler in der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe als auch der Superkomplexbildung sein. Der Superkomplex-Assembly Faktor SCAF 1, auch bekannt als COX7a2l, konnte als Stabilisierungseinheit zwischen Komplex III und Komplex IV identifiziert werden [51, 52]. Die mtBPL-Mäuse zeigten zu allen gemessenen Alterszeitpunkten eine verminderte Genexpression von *COX7a2l* im Vergleich zum Kontrollmausstamm, was auf eine Dysfunktion im Superkomplexaufbau hindeutet und damit als weiterer Faktor der Begünstigung der Mitochondriencluster-Bildung gewertet werden kann.

Für ein besseres Verständnis zur altersabhängigen Clusterung der Mitochondrien sollte weiterführend die Komplexaktivität, insbesondere von Komplex I und IV, analysiert werden. Die Untersuchung der Atmungskettenkomplexe auf Proteinebene könnte zudem weiter Aufschluss über die Translation der Komplexe und über die Bildung von Superkomplexen geben.

4.5 Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Um Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel durch die Synergie der Mutationen in der ND5- und COX3-Untereinheit zu analysieren, wurden physiologische Parameter wie das Körpergewicht und die Nüchtern-Blutglukosekonzentration im Altersverlauf untersucht. Wie bereits in anderen Arbeiten mit conplastischen Mausstämmen gezeigt werden konnte [165, 166], wurde auch für den mtBPL-Mausstamm eine kontinuierliche Gewichtszunahme innerhalb der ersten 12 Lebensmonate festgestellt. Obwohl beide Mausstämme freien Zugang zu Futter und Wasser hatten und die Nahrungsaufnahme der Mäuse im Alter zunahm, zeigten die mtBPL-Mäuse eine geringere Gewichtszunahme. Dieser verminderte Gewichtsanstieg kann auf die steigende freiwillige Aktivität der mtBPL-Mäuse im Altersverlauf zurückgeführt werden. Der conplastische mtALR-Mausstamm, welcher eine Punktmutation in der ND2-Untereinheit des Komplexes I trägt, zeigte ab dem 12. bis 24. Lebensmonat einen konstanten Gewichtsverlauf [167]. Es kann spekuliert werden, dass der mtBPL-Mausstamm mit fortschreitendem Alter (bis 24 Monate) ebenfalls eine stagnierende Zunahme des Körpergewichts zeigt, da sowohl mtBPL- als auch mtALR-Mäuse bis zum Alter von 12 Monaten ein geringeres Körpergewicht als der Kontrollmausstamm aufwiesen. Der Grundumsatz der Mäuse wurde mittels Kalorimetrie bestimmt. Hierbei wurde der Respiratorische Quotient (RQ) ermittelt, welcher das Verhältnis zwischen abgeatmetem CO₂ und

dem vom Körper aufgenommenen O₂ wiedergibt. Beim Stoffwechsel von Fetten ergibt sich ein RQ-Wert von 0,7, beim Kohlenhydratstoffwechsel ein RQ-Wert von 1,0 und beim Stoffwechsel von Proteinen ein RQ-Wert von ungefähr 0,8. Befinden sich alle Nährstoffe in Balance, so liegt der RQ bei 0,82 [168]. Im Kontrollmausstamm konnte zum Zeitpunkt 12 Monate ein RQ von durchschnittlich 0,85 ermittelt werden. Diese Werte deuten auf eine ausgeglichene Verstoffwechselung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen im Organismus hin. Dagegen lag der RQ der mtBPL-Mäuse im juvenilen Alter von 3 Monaten bei 0,96 und sank im Alter von 12 Monaten auf 0,77 ab. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stoffwechsel von mtBPL-Mäusen im Alterungsverlauf von einem Kohlenhydratstoffwechsel in einen überwiegenden Fett- und Proteinstoffwechsel übergeht.

Die Glucokinase (GCK) gehört zu der Familie der Hexokinasen, wird vorwiegend in den Hepatozyten der Leber exprimiert und spielt eine wesentliche Rolle für die Homöostase der Blutglukose [169]. In den Langerhans'schen Inseln des Pankreas nimmt die GCK zudem die Funktion eines Glukosesensor ein [170-172]. Das Enzym setzt Glukose unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat um und katalysiert somit den ersten Schritt der Glykolyse. Die GCK wurde in jungen mtBPL-Mäusen vermindert exprimiert und lag nur bei etwa 60 % der *GCK*-Genexpression im Vergleich zu der der Kontrollmäuse gleichen Alters. Die Expression der Glucokinase wird dabei maßgeblich durch eine Erhöhung der Blutglukosekonzentration induziert. Bis zum Alter von 9 Monaten konnte in beiden Mausstämmen eine Zunahme der Nüchtern-Blutglukosekonzentration bestimmt werden, wobei alle gemessenen Werte im normoglykämischen Bereich lagen. Dennoch wurde im Verlauf der Alterung in beiden Mausstämmen eine verminderte Genexpression der GCK ermittelt. Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass die Leber nicht für den gesteigerten Kohlenhydratstoffwechsel der 3 Monate alten mtBPL-Mäuse verantwortlich ist.

Eine altersabhängige Zunahme des Nüchtern-Blutglukosespiegels bis zum 9. Lebensmonat konnte auch in anderen Arbeiten sowohl für den Kontrollmausstamm [167] als auch für den conplastischen mtNOD-Mausstamm [166], gezeigt werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die in dieser Arbeit untersuchten mtDNA-Mutationen im mtBPL-Mausstamm keine signifikanten Auswirkungen auf die Glukosehomöostase und das Körpergewicht bis zum Alter von 12 Monaten haben. Die Entwicklung von Adipositas und einer krankhaften Zunahme des Blutglukosespiegels wird häufig durch eine hyperkalorische Ernährung beschleunigt. In verschiedenen Studien konnte dieser Effekt durch Fütterung einer Hochfettdiät induziert werden. Dabei zeigten insbesondere verschiedene conplastische Mausstämme eine ausgeprägte Hyperglykämie [141, 165, 173].

Aufgrund des gesteigerten Kohlenhydratstoffwechsels in 3 Monate alten mtBPL-Mäusen lag der Fokus in der vorliegenden Arbeit zunächst auf der Genexpression der GCK. Für ein genaueres Verständnis sollten die Analysen auf weitere Stoffwechselenzyme, wie beispielsweise Pyruvatdehydrogenase (PDH), sowie auch auf die Proteinexpression von GCK und PDH ausgeweitet werden. Ebenfalls von Interesse ist die Untersuchung von Mäusen, welche älter als 12 Monate sind. Hieraus könnte geklärt werden, ob es zu einem späteren Lebensalter zur Ausprägung eines Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) kommt. Es ist bekannt, dass ein hyperglykämischer Blutglukosespiegel zu Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels, somit zur Erhöhung von ROS und zu einer Insulinresistenz führt, was die Entstehung eines T2DM begünstigt [174].

4.6 Auswirkungen der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf den Fettstoffwechsel

Nach dem erhöhten Kohlenhydratstoffwechsel der mtBPL-Mäuse im Alter von 3 Monaten konnte im Alter von 12 Monaten ein überwiegender Fettstoffwechsel beobachtet werden. Verschiedene Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diesen erhöhten Fettstoffwechsel und deuten zusätzlich auf eine erhöhte Lipogenese im Lebergewebe der mtBPL-Mäuse im Alter hin. Das relative Lebergewicht nahm im Kontrollmausstamm kontinuierlich bis zum 9. Lebensmonat zu und blieb anschließend konstant, während es im mtBPL-Mausstamm stetig bis zum 12. Lebensmonat zunahm. Diese signifikante Gewichtszunahme der Leber zwischen dem 9. und 12. Lebensmonat ist auf eine vermehrte Fetteinlagerung zurückzuführen. In beiden Stämmen konnte eine altersabhängige Zunahme der Fettakkumulation in der Leber nachgewiesen werden. In 12 Monate alten mtBPL-Mäusen war diese allerdings um das Zehnfache erhöht. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Bestimmung der hepatischen Triglyceridkonzentrationen beider Mausstämmen. Im Vergleich zu Kontrollmäusen konnte in mtBPL-Mäusen vor allem im Alter von 12 Monaten ein deutlich erhöhter Triglyceridgehalt der Leber detektiert werden. Die Triglycerid-Konzentrationen im Blut waren hingegen in beiden Stämmen im Verlauf der Alterung unverändert. Um den Fettstoffwechsel der Leber auf molekularer Ebene näher zu beleuchten, wurden alterungsabhängige Expressionsanalysen der Gene *FASN*, *SREBF1*, *PCX* und *CPT1 α* durchgeführt. Das Gen *FASN* kodiert für die Fettsäure-Synthase. Die Fettsäure-Synthase ist ein dimerer Multienzymkomplex und katalysiert die *de novo*-Synthese von Fettsäuren, welche wiederum in Triacylglyceriden als Energieträger gespeichert werden können. Dieses Ergebnis bestätigt die

vermehrte Fettakkumulation in der Leber der mtBPL-Mäuse im Alter von 12 Monaten. Der mtBPL-Mausstamm zeigte zu allen Alterszeitpunkten eine erhöhte Genexpression von *FASN* im Vergleich zum Kontrollstamm. Mit steigendem Triglyceridgehalt in der Leber der 12 Monate alten mtBPL-Mäuse wurde die *FASN* etwas vermindert exprimiert, jedoch immer noch deutlich höher als im Kontrollmausstamm. Da im Blutserum die Triglyceridkonzentration im physiologischen Bereich lag, kann über eine Dysfunktion im Transportmechanismus der Fette spekuliert werden. Normalerweise werden Triglyceride mittels VLDL in Gewebe wie Fettgewebe oder Muskel transportiert, um dort eingelagert zu werden. Um diese These zu bestätigen, sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich des Triglyceridtransports erfolgen.

Eine gesteigerte hepatische Lipogenese zeigte sich auch durch eine Induktion der Genexpression von *SREBF-1*. Das Protein SREBF-1 ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, welcher ein breites Spektrum von lipogenen Enzymen u. a. der Fettsäure-Synthase in der Leber stimuliert. [175]. Im Gegensatz zum Kontrollstamm war die Genexpression von SREBP-1 besonders ab dem 9. Lebensmonat im mtBPL-Mausstamm induziert. Des Weiteren wurde ein im Alterungsverlauf zunehmendes Genexpressionslevel von *PCX* in der Leber detektiert. Die Pyruvatcarboxylase (PCX) katalysiert die anaplerotische Reaktion von Pyruvat zu Oxalacetat. Eine vermehrte *PCX*-Genexpression könnte auch Folge der induzierten Fettsäurebiosynthese sein. Denn das für die Fettsäurebiosynthese benötigte Acetyl-CoA wird in Form von Citrat aus dem Mitochondrium ausgeschleust und dabei Oxalacetat als Intermediat aus dem Citratzyklus entzogen. Das Oxalacetat kann dem Citratzyklus durch die PCX erneut bereitgestellt werden, um das Fließgleichgewicht im Citratzyklus aufrecht zu erhalten. Eine gesteigerte Lipogenese lässt sich also nicht nur durch die stark erhöhten Triglyceridmengen, sondern ebenfalls durch die induzierte Transkription von *FASN* und SREBP-1 in der Leber von mtBPL-Mäusen bestätigen.

Weiterführend wurde auch die Genexpression von *CPT1 α* untersucht. *CPT1 α* befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran und ist Bestandteil des Carnitin-abhängigen Transports von Fettsäuren in die Matrix der Mitochondrien. Im Kontrollmausstamm wurde das Gen der *CPT1 α* zunächst konstant exprimiert und erst im Alter von 12 Monaten hochreguliert. Die ebenfalls mit dem Alter leicht ansteigende Genexpression von *CPT1 α* in der Leber der mtBPL-Mäuse lässt auf eine altersabhängige Zunahme der β -Oxidation schließen. Eine Ursache könnte eine Zunahme an Fettsäuren im Zytosol darstellen. Durch langkettige Fettsäuren wird die Transkriptionsrate des *CPT1 α* -Gens gesteigert und somit der Import von Fettsäuren ins Mitochondrium und folgend die

β -Oxidation angetrieben. Dies könnte auch im Zusammenhang mit der gesteigerten Futteraufnahme stehen.

Ein bedeutendes Fettstoffwechsel-regulierendes Hormon ist Insulin. Insulin aktiviert sowohl FASN als auch den Transkriptionsfaktor SREBF-1 [176]. Da die Insulinsekretion durch den Blutzuckerspiegel bestimmt wird und dieser in den mtBPL-Mäusen im Alter von 9 und 12 Monaten anstieg, lässt das einen erhöhten Insulinspiegel in mtBPL-Mäusen vermuten. Die Seruminsulinkonzentration sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden, da eine Hyperinsulinämie und eine übermäßige Fetteinlagerung in der Leber typische Merkmale der NAFLD sind [120, 121, 177]. Des Weiteren werden eine verminderte mtDNA-Kopienzahl und Veränderungen der Mitochondrienmorphologie mit der NAFLD assoziiert [130, 178]. Die Leber der untersuchten mtBPL-Mäuse wies bereits im Alter von 12 Monaten viele Charakteristika der NAFLD auf. Zusätzlich wurde in der Arbeit von Sookoian *et al.* eine direkte Korrelation zwischen Patienten mit Auftreten einer NAFLD und NASH und einer erhöhten mtDNA-Variabilität des NADH-Dehydrogenase-Komplexes gefunden [179]. Somit scheint der mtBPL-Mausstamm (mit seinen zwei Punktmutationen in Untereinheiten der Atmungskette) ein geeignetes Mausmodell für die altersabhängige Pathogenese eines Metabolischen Syndroms beziehungsweise einer NAFLD zu sein.

4.7 Einfluss der ND5- und COX3-Genpolymorphismen auf die submaximale Ausdauer

Mutationen der mtDNA führen häufig zu mitochondrialen Myopathien einhergehend mit Störungen der muskulären Energiebereitstellung. Aus diesem Grund bestand weiterführend ein Interesse in der Analyse des Einflusses der beiden mtDNA-Punktmutationen auf die Muskulatur und dessen Belastbarkeit. Dafür wurde ein computergesteuertes Laufband genutzt und die submaximale Laufleistung der mtBPL-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass der erhöhte Kohlenhydratstoffwechsel mit einer gesteigerten Laufleistung im Alter von 3 Monaten in den mtBPL-Mäusen korreliert. Zur Verifikation der gesteigerten Fitness im jungen Alter sollen zum Verständnis der altersbedingten Adaptationsmechanismen mit Auswirkung auf den respiratorischen Quotienten, Funktionsanalysen, histochemische Strukturanalysen sowie molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Mitochondriale Veränderungen bedingen die Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen, wie beispielsweise Typ-2-Diabetes mellitus, Adipositas oder einer NAFLD. Mitochondrien gelten als Hauptproduzenten von reaktiven Sauerstoffspezies, welche als Nebenprodukt in der oxidativen Phosphorylierung generiert werden. Ein enormer Anstieg von ROS wirkt sich negativ auf die Struktur von Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden aus, was eine Veränderung der biologischen Aktivität zur Folge haben kann. Des Weiteren kann eine Dysfunktion der mitochondrialen Dynamik die Optimierung von zellulären Prozessen, wie der ATP- und Calcium-Homöostase beeinträchtigen. Dieser Prozess ist noch wenig erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt zweier mtDNA-Punktmutationen des OXPHOS-Systems auf die mitochondriale Funktion und den Metabolismus in der Leber im Alterungsprozess von Mäusen zu charakterisieren. Hierfür wurden zwei conplastische Mausstämme eingesetzt, welche im nukleären Genom identisch sind, sich aber im mitochondrialen Genom durch zwei Punktmutationen unterscheiden. Der conplastische Mausstamm C57BL/6NTac-mtBPL/1J (mtBPL) trägt im Vergleich zum Kontrollmausstamm C57BL/6NTac-mtAKR/J zwei mtDNA-Punktmutationen in Untereinheiten der Atmungskette, einerseits in der ND5-Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und andererseits in der COX3-Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV). Die Untersuchungen der Mäuse erfolgten zu den Alterszeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Monate.

In beiden Mausstämmen konnte zunächst ein altersabhängiger Anstieg der ROS-Produktion in der Leber gezeigt werden, wobei sich die ROS-Produktion von mtBPL-Mäusen im Alter von 12 Monaten signifikant erhöhte. Die Genexpressionsmuster der antioxidativen Enzyme *Katalase*, *SOD1*, *GPX1*, *PRDX3* und auch das Entkoppler-Protein *UCP2* korrelierten mit der ROS-Produktion des Kontrollmausstammes bis zum Alter von 9 Monaten. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigte der mtBPL-Mausstamm im Altersverlauf eine abnehmende Genexpression von *GPX3*, *PRDX3* und *UCP2*, während *Katalase*, *SOD1* und *SOD2* konstant exprimiert wurden. Es lässt sich vermuten, dass die Mutation in der ND5-Untereinheit auch in Synergie mit der COX3-Punktmutation im mtBPL-Mausstamm die Koordination der antioxidativen Antwort negativ beeinflusst. Die ermittelten, verminderten mtDNA-Kopienzahl und TFAM-Genexpression zusammen mit dem signifikant geringeren Genexpressionslevel der nukleär-kodierten aber

erhöhten mitochondrial-kodierten Untereinheiten der Atmungskette, lassen eine Dysfunktion in der mitochondrialen Transkription und Assemblierung der Komplexe I und IV im mtBPL-Mausstamm vermuten. Um die ATP-Generierung über die Atmungskette weiterhin zu gewährleisten, nutzt der mtBPL-Mausstamm unter Umgehung von Komplex I die Möglichkeit von Seiteneinstiegen, wodurch jedoch weniger ATP geliefert werden kann. Dies zeigt sich bei den mtBPL-Mäusen im jungen Alter von 3 und 6 Monaten. Im Alter von 9 und 12 Monaten war der ATP-Level vergleichbar mit dem der Kontrollmäuse. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Atmungskette im Alter von 9 und 12 Monaten vermehrt abläuft. Eine Hochregulation der Atmungskette begünstigt wiederum die Bildung von ROS, was mit den erhobenen Daten zur vermehrten Bildung in diesem Lebensalter in der Leber korreliert.

Um die Energiegewinnung aufrecht zu halten, deuten die erhobenen Daten auf verschiedene Kompensationsmechanismen im mtBPL-Mausstamm hin. So lässt sich vermuten, dass es aufgrund einer Dysfunktion in der Komplex-Assemblierung zur vermehrten Fusion der Mitochondrien kommt. Hierdurch erhöht sich der Anteil an geschädigten Bestandteilen der Mitochondrien, da eine effektive Autophagie unterbunden wird. Die mtBPL-Mäuse zeigten im Alter von 12 Monaten einen vorrangigen Fettabbau. Auch dies kann als ein Adaptationsmechanismus zur höheren Energiegewinnung interpretiert werden. In der Leber der Mäuse konnte sowohl eine altersabhängige Zunahme der *PCX*- als auch der *CPT1*-Genexpression nachgewiesen werden. Die *FASN*-Expression war im Alterungsprozess der mtBPL-Mäuse deutlich erhöht, zeigt jedoch eine Expressionsabnahme bis zum Alter von 12 Monaten, sodass neben dem Fettabbau auf eine gleichzeitige Neusynthese von Fetten geschlossen werden kann, die aber scheinbar nicht adäquat genutzt werden können. Eine deutlich erhöhte Triglycerideinlagerung in der Leber 12 Monate alter mtBPL-Mäuse bestätigt diese Annahme. Der gleichzeitige Anstieg der Nüchtern-Blutglukosekonzentration der mtBPL-Mäuse kann als beginnende Insulinresistenz interpretiert werden.

Demnach konnte gezeigt werden, dass das Zusammenwirken beider mtDNA-Punktmutationen im mtBPL-Mausstamm den Leberstoffwechsel signifikant beeinflusst. Die erhöhte ROS-Produktion, verminderte mtDNA-Kopienzahl, veränderte Mitochondrienmorphologie sowie die erhöhte Fettakkumulation begünstigen im Alter von 12 Monaten schlussendlich die Insulinresistenz und die Pathogenese einer NAFLD. Weitere Untersuchungen zum mtBPL-Mausstamm sowohl unter Einbeziehung eines hohen Lebensalters als auch anderer Organe sind daher von besonderem Interesse.

6 Literaturverzeichnis

1. Cox, N.u., *Lehninger Biochemie*. Vol. 4. 2011: Springer Verlag.
2. Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, 1994,, New York: Garland Publishing Inc.
3. Rehner, G., *Biochemie der Ernährung*. Vol. 3. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
4. Frey, T.G. and C.A. Mannella, *The internal structure of mitochondria*. Trends Biochem Sci, 2000. 25: p. 319-24.
5. Marom, M., A. Azem, and D. Mokranjac, *Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: still a long way to go*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1808(3): p. 990-1001.
6. Bartolak-Suki, E., et al., *Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors*. Int J Mol Sci, 2017. 18(8).
7. Chinnery, P.F. and G. Hudson, *Mitochondrial genetics*. Br Med Bull, 2013. 106: p. 135-59.
8. Andersson, S.G., et al., *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. Nature, 1998. 396(6707): p. 133-40.
9. Wallace, D.C., *Mitochondrial diseases in man and mouse*. Science, 1999. 283(5407): p. 1482-8.
10. Gustafsson, C.M., M. Falkenberg, and N.G. Larsson, *Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA*. Annu Rev Biochem, 2016. 85: p. 133-60.
11. Koopman, W.J., et al., *OXPHOS mutations and neurodegeneration*. EMBO J, 2013. 32(1): p. 9-29.
12. Friedman, J.R. and J. Nunnari, *Mitochondrial form and function*. Nature, 2014. 505(7483): p. 335-43.
13. Gonzalez-Freire, M., et al., *Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. 70(11): p. 1334-42.
14. Bogenhagen, D. and D.A. Clayton, *Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle*. Cell, 1977. 11(4): p. 719-27.
15. Campbell, C.T., J.E. Kolesar, and B.A. Kaufman, *Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1819(9-10): p. 921-9.
16. Kang, D. and N. Hamasaki, *Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1042:p. 101-8.
17. Kaufman, B.A., et al., *The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures*. Mol Biol Cell, 2007. 18(9): p. 3225-36.

18. Wallace, D.C. and D. Chalkia, *Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. 5(11): p. a021220.
19. Schaefer, A.M., et al., *Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults*. Ann Neurol, 2008. 63(1): p. 35-9.
20. Schaefer, A.M., et al., *The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future*. Biochim Biophys Acta, 2004. 1659(2-3): p. 115-20.
21. Davis, R.L. and C.M. Sue, *The genetics of mitochondrial disease*. Semin Neurol, 2011. 31(5): p. 519-30.
22. Rossignol, R., et al., *Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies*. J Biol Chem, 1999. 274(47): p. 33426-32.
23. Hirose, M., et al., *Low-level mitochondrial heteroplasmy modulates DNA replication, glucose metabolism and lifespan in mice*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 5872.
24. Wallace, D.C., *A mitochondrial bioenergetic etiology of disease*. J Clin Invest, 2013. 123(4): p. 1405-12.
25. Gonzalez-Freire, M., R. de Cabo, and M. Bernier, *Reconsidering the Role of Mitochondria in Aging*, in *Journals of Gerontology: MEDICAL SCIENCES*. 2015. p. 1-9.
26. Tuppen, H.A., et al., *Mitochondrial DNA mutations and human disease*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1797(2): p. 113-28.
27. Pavlakis, S.G., et al., *Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome*. Ann Neurol, 1984. 16(4): p. 481-8.
28. Andalib, S., et al., *Mitochondrial DNA T4216C and A4917G variations in multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2015. 356(1-2): p. 55-60.
29. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nat Rev Genet, 2005. 6(5): p. 389-402.
30. Poulton, J., et al., *Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study*. Hum Mol Genet, 2002. 11(13): p. 1581-3.
31. Chinnery, P.F., et al., *The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy*. Brain, 2001. 124(Pt 1): p. 209-18.
32. Chol, M., et al., *The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency*. J Med Genet, 2003. 40(3): p. 188-91.
33. Kolarova, H., et al., *Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5*. Ophthalmic Genet, 2016. 37(4): p. 419-423.
34. Tabebi, M., et al., *A novel mutation MT-COIII m.9267G>C and MT-COI m.5913G>A mutation in mitochondrial genes in a Tunisian family with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with severe nephropathy*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. 459(3): p. 353-60.
35. Berg J.M., T.J.L., Gatto G.J., Stryer L., *Stryer Biochemie*. Vol. 8. 2018: Springer Spektrum.

36. Jonathan, H., F.-M. Shelagh , and M. Denise, *Energy Transduction: Proton Transfer Through the Respiratory Complexes*, in *Annual Review of Biochemistry* 2006. p. 165-187.
37. Mimaki, M., et al., *Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1817(6): p. 851-62.
38. Wirth, C., et al., *Structure and function of mitochondrial complex I*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1857(7): p. 902-14.
39. Baradaran, R., et al., *Crystal structure of the entire respiratory complex I*. Nature, 2013. 494(7438): p. 443-8.
40. Chomyn, A., *Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells*. J Bioenerg Biomembr, 2001. 33(3): p. 251-7.
41. Pecina, P., et al., *Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly*. Physiol Res, 2004. 53 Suppl 1: p. S213-23.
42. Timón-Gómez A., N.E., Abriata L.A., Vila A.J., Hosler J., Barrientos A., *Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments.*, in *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2018. p. 163-178.
43. Zong S., W.M., Gu J., Liu T., Guo R., Yang M., *Structure of the intact I4-subunit human cytochrome c oxidase.*, in *Cell Research*. 2018. p. 1026–1034.
44. Kadenbach B., S.A., Hüther F.J., Reimann A., Steverding D., *Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase.*, in *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1991. p. 321-334.
45. G., K.O.a.R., *Biogenesis of cytochrome c oxidase*, in *Mitochondrion*. 2005. p. 363-388.
46. L.J., W.K.S.a.P., *Phospholipid Vesicles Containing Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome c Oxidase and Subunit Ill- Deficient Enzyme: Analysis of Respiratory Control and Proton Translocating Activities.*, in *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 1990. p. 413-420.
47. Schagger, H. and K. Pfeiffer, *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. EMBO J, 2000. 19(8): p. 1777-83.
48. Letts, J.A., K. Fiedorczuk, and L.A. Sazanov, *The architecture of respiratory supercomplexes*. Nature, 2016. 537(7622): p. 644-648.
49. Wu, M., et al., *Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I₁III₂IV₁*. Cell, 2016. 167(6): p. 1598-1609 e10.
50. Guo, R., et al., *Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I₂III₂IV₂*. Cell, 2017. 170(6): p. 1247-1257 e12.
51. Ikeda, K., et al., *A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle*. Nat Commun, 2013. 4: p. 2147.
52. Perez-Perez, R., et al., *COX7A2L Is a Mitochondrial Complex III Binding Protein that Stabilizes the III₂+IV Supercomplex without Affecting Respirasome Formation*. Cell Rep, 2016. 16(9): p. 2387-98.
53. Mourier, A., et al., *The respiratory chain supercomplex organization is independent of COX7a2l isoforms*. Cell Metab, 2014. 20(6): p. 1069-75.

54. Acin-Perez, R., et al., *Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria*. Mol Cell, 2004. 13(6): p. 805-15.
55. Enriquez, J.A., *Supramolecular Organization of Respiratory Complexes*. Annu Rev Physiol, 2016. 78: p. 533-61.
56. Maranzana, E., et al., *Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I*. Antioxid Redox Signal, 2013. 19(13):p. 1469-80.
57. Moreno-Lastres, D., et al., *Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly*. Cell Metab, 2012. 15(3): p. 324-35.
58. Lewis, M.R.L.a.W.H., *Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures*. The American Journal of Anatomy 1915. 17: p. 339-401.
59. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J Cell Biol, 1981. 88(3): p. 526-35.
60. Bereiter-Hahn, J. and M. Voth, *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. Microsc Res Tech, 1994. 27(3):p. 198-219.
61. Rizzuto, R., et al., *Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo*. Curr Biol, 1996. 6(2): p. 183-8.
62. van der Bliek, A.M., Q. Shen, and S. Kawajiri, *Mechanisms of mitochondrial fission and fusion*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. 5(6).
63. Tieu, J.I.a.K., *Mitochondrial Dynamics as a Potential Therapeutic Target for Parkinson's Disease?* ACNR, 2014. 14: p. 6-8.
64. Koshiba, T., et al., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science, 2004. 305(5685): p. 858-62.
65. Zorzano, A., et al., *Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism*. Semin Cell Dev Biol, 2010. 21(6): p. 566-74.
66. Otera, H., N. Ishihara, and K. Mihara, *New insights into the function and regulation of mitochondrial fission*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1833(5): p. 1256-68.
67. Otera, H., et al., *Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells*. J Cell Biol, 2010. 191(6): p. 1141-58.
68. Archer, S.L., *Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases*. N Engl J Med, 2013. 369(23): p. 2236-51.
69. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. 120(4): p. 483-95.
70. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. 59(3): p. 527-605.
71. Brown, G.C. and V. Borutaite, *There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells*. Mitochondrion, 2012. 12(1): p. 1-4.
72. Fridovich, I., *Mitochondria: are they the seat of senescence?* Aging Cell, 2004. 3(1):p. 13-6.
73. Rhee, S.G., *Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med, 1999. 31(2): p. 53-9.

74. Kudin, A.P., D. Malinska, and W.S. Kunz, *Sites of generation of reactive oxygen species in homogenates of brain tissue determined with the use of respiratory substrates and inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1777(7-8): p. 689-95.
75. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. 417(1): p. 1-13.
76. Quinlan, C.L., et al., *Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates*. Redox Biol, 2013. 1: p. 304-12.
77. Rimessi, A., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. 81(Pt B): p. 281-293.
78. Brand, M.D., *Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2016. 100: p. 14-31.
79. Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang, *Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling*. Biochem J, 2012. 441(2): p. 523-40.
80. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. 29(3-4): p. 222-30.
81. Cichoz-Lach, H. and A. Michalak, *Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases*. World J Gastroenterol, 2014. 20(25): p. 8082-91.
82. Ziech, D., et al., *Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. 711(1-2): p. 167-73.
83. Hur, J., et al., *Literature-based discovery of diabetes- and ROS-related targets*. BMC Med Genomics, 2010. 3: p. 49.
84. Wu, Z., et al., *Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production*. Neurobiol Aging, 2012. 33(1): p. 199 e1-12.
85. Vigneron, A. and K.H. Vousden, *p53, ROS and senescence in the control of aging*. Aging (Albany NY), 2010. 2(8): p. 471-4.
86. Ratnam, D.V., et al., *Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective*. J Control Release, 2006. 113(3): p. 189-207.
87. Christofidou-Solomidou, M. and V.R. Muzykantov, *Antioxidant strategies in respiratory medicine*. Treat Respir Med, 2006. 5(1): p. 47-78.
88. Noor, R., S. Mittal, and J. Iqbal, *Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases*. Med Sci Monit, 2002. 8(9): p. RA210-5.
89. Abreu, I.A. and D.E. Cabelli, *Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1804(2): p. 263-74.
90. Yasui, K. and A. Baba, *Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation*. Inflamm Res, 2006. 55(9): p. 359-63.
91. He, L., et al., *Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species*. Cell Physiol Biochem, 2017. 44(2): p. 532-553.

92. Buettner, G.R., et al., *A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state*. Free Radic Biol Med, 2006. 41(8): p. 1338-50.
93. Chelikani, P., I. Fita, and P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(2): p. 192-208.
94. Kirkman, H.N. and G.F. Gaetani, *Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries*. Trends Biochem Sci, 2007. 32(1): p. 44-50.
95. Liu, H., et al., *Oral administration of Lactobacillus fermentum I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets*. J Agric Food Chem, 2014. 62(4): p. 860-6.
96. Muges, G., et al., *Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: a mechanistic study*. J Am Chem Soc, 2001. 123(5): p. 839-50.
97. Brand, M.D. and T.C. Esteves, *Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3*. Cell Metab, 2005. 2(2): p. 85-93.
98. Mailloux, R.J. and M.E. Harper, *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production*. Free Radic Biol Med, 2011. 51(6): p. 1106-15.
99. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. 84(1): p. 277-359.
100. Azzu, V. and M.D. Brand, *The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins*. Trends Biochem Sci, 2010. 35(5): p. 298-307.
101. Echtay, K.S., et al., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants*. J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47129-35.
102. Teshima, Y., et al., *Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes*. Circ Res, 2003. 93(3): p. 192-200.
103. Lee, S.C., C.A. Robson-Doucette, and M.B. Wheeler, *Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin*. J Endocrinol, 2009. 203(1): p. 33-43.
104. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(2): p. 399-404.
105. Haffner, S.M., et al., *Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X)*. Diabetes, 1992. 41(6): p. 715-22.
106. Crepaldi, P.A.a.G., *Essential hyperlipidemia, obesity and diabetes*. Diabetologia, 1965. 1: p. 137.
107. M. Hanefeld, F.S., · A. Ceriello, , *Geschichte und Definition(en) des metabolischen Syndroms*. Internist, 2007. 48: p. 117-125.
108. Reaven, G.M., *Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. 1988. Nutrition, 1997. 13(1): p. 65; discussion 64, 66.
109. Gupta, A. and V. Gupta, *Metabolic syndrome: what are the risks for humans?* Biosci Trends, 2010. 4(5): p. 204-12.

110. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome pandemic*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(4): p. 629-36.
111. Cameron, A.J., J.E. Shaw, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2004. 33(2): p. 351-75, table of contents.
112. Goodpaster, B.H., et al., *Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women*. Arch Intern Med, 2005. 165(7): p. 777-83.
113. Stang, A., et al., *Regional differences in body fat distributions among people with comparable body mass index: a comparison across six German population-based surveys*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2011. 18(1): p. 106-14.
114. Ford, E.S., W.H. Giles, and A.H. Mokdad, *Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults*. Diabetes Care, 2004. 27(10): p. 2444-9.
115. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. 15(7): p. 539-53.
116. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. Science, 2003. 300(5622): p. 1140-2.
117. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2004. 350(7): p. 664-71.
118. Pravenec, M., et al., *Direct linkage of mitochondrial genome variation to risk factors for type 2 diabetes in conplastic strains*. Genome Res, 2007. 17(9): p. 1319-26.
119. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study*. Hepatology, 2005. 42(1): p. 44-52.
120. Falck-Ytter, Y., et al., *Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes*. Semin Liver Dis, 2001. 21(1): p. 17-26.
121. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2001. 50(8): p. 1844-50.
122. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. 41(6): p. 1313-21.
123. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Definition & Facts of NAFLD & NASH*, 2016; Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/nafl-d-nash/definition-facts>.
124. Lim, J.S., et al., *The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. 7(5): p. 251-64.
125. Lustig, R.H., *Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol*. J Am Diet Assoc, 2010. 110(9): p. 1307-21.
126. Williams, T., *Metabolic Syndrome: Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. FP Essent, 2015. 435: p. 24-9.
127. Ibdah, J.A., et al., *Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance*. Gastroenterology, 2005. 128(5): p. 1381-90.

128. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease*. J Hepatol, 2005. 42(6): p. 928-40.
129. Begriche, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion, 2006. 6(1): p. 1-28.
130. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. 120(5): p. 1183-92.
131. Wei, Y., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction*. World J Gastroenterol, 2008. 14(2): p. 193-9.
132. MGI Jackson Laboratory. *Conplastic Strain*. 2019,03,19 Available from: <http://www.informatics.jax.org/glossary/conplastic>.
133. Yu, X., et al., *Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains*. Genome Res, 2009. 19(1): p. 159-65.
134. Goios, A., et al., *mtDNA phylogeny and evolution of laboratory mouse strains*. Genome Res, 2007. 17(3): p. 293-8.
135. Kiselycznyk, C. and A. Holmes, *All (C57BL/6) Mice are not Created Equal*. Front Neurosci, 2011. 5: p. 10.
136. Taconic. *Black 6 (B6NTac) Inbred*. 2019, ; Available from: <https://www.taconic.com/mouse-model/black-6-b6ntac>.
137. Weiss, H., et al., *The mitochondrial Atp8 mutation induces mitochondrial ROS generation, secretory dysfunction, and beta-cell mass adaptation in conplastic B6-mtFVB mice*. Endocrinology, 2012. 153(10): p. 4666-76.
138. Chauhan, A., et al., *Dissecting Long-Term Glucose Metabolism Identifies New Susceptibility Period for Metabolic Dysfunction in Aged Mice*. PLoS One, 2015. 10(11): p. e0140858.
139. Roolf, C., et al., *Polymorphism in Murine mtATP8 Gene Correlates with Decreased Reactive Oxygen Species in Aging Hematopoietic Cells*. In Vivo, 2016. 30(6): p. 751-760.
140. Muller, S., et al., *The mtDNA nt7778 G/T polymorphism augments formation of lymphocytic foci but does not aggravate cerulein-induced acute pancreatitis in mice*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e102266.
141. Schroder, T., et al., *Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis*. Mol Metab, 2016. 5(4): p. 283-295.
142. Niemann, J., et al., *An mtDNA mutation accelerates liver aging by interfering with the ROS response and mitochondrial life cycle*. Free Radic Biol Med, 2017. 102: p. 174-187.
143. Niemann, J., et al., *Cytosolic and mitochondrial Ca(2+) concentrations in primary hepatocytes change with ageing and in consequence of an mtDNA mutation*. Cell Calcium, 2019. 82: p. 102055.
144. Reichart, G., et al., *Mitochondrial complex IV mutation increases reactive oxygen species production and reduces lifespan in aged mice*. Acta Physiol (Oxf), 2019. 225(4): p. e13214.

145. Schauer, M., et al., *A mutation in the NADH-dehydrogenase subunit 2 suppresses fibroblast aging*. Oncotarget, 2015. 6(11): p. 8552-66.
146. Hirose, M., et al., *Maternally Inherited Differences within Mitochondrial Complex I Control Murine Healthspan*. Genes (Basel), 2019. 10(7).
147. Iwata, S., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans*. Nature, 1995. 376(6542): p. 660-9.
148. Meissner, C., *Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process?* Z Gerontol Geriatr, 2007. 40(5): p. 325-33.
149. DENHAM HARMAN, *AGING: A THEORY BASED ON FREE RADICAL AND RADIATION CHEMISTRY* Journal of Gerontology, 1956,. 11(3): p. 298-300.
150. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. 21(10): p. 569-76.
151. Blok, M.J., et al., *Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease*. J Med Genet, 2007. 44(4): p. e74.
152. Shanske, S., et al., *The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases*. Arch Neurol, 2008. 65(3): p. 368-72.
153. Fang, H., et al., *Exercise intolerance and developmental delay associated with a novel mitochondrial ND5 mutation*. Sci Rep, 2015. 5: p. 10480.
154. Perales-Clemente, E., et al., *Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly*. Mol Cell Biol, 2010. 30(12): p. 3038-47.
155. Vidoni, S., et al., *MR-1S Interacts with PET100 and PET117 in Module-Based Assembly of Human Cytochrome c Oxidase*. Cell Rep, 2017. 18(7): p. 1727-1738.
156. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. 82(1): p. 47-95.
157. Floreani, M., et al., *Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. FEBS J, 2005. 272(5): p. 1124-35.
158. Tantama, M. and G. Yellen, *Imaging changes in the cytosolic ATP-to-ADP ratio*. Methods Enzymol, 2014. 547: p. 355-71.
159. Meyer, J.N., T.C. Leuthner, and A.L. Luz, *Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity*. Toxicology, 2017. 391: p. 42-53.
160. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. 337(6098): p. 1062-5.
161. Parone, P.A., et al., *Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA*. PLoS One, 2008. 3(9): p. e3257.
162. D'Erchia, A.M., et al., *Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity*. Mitochondrion, 2015. 20: p. 13-21.
163. Rocher, C., et al., *Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases*. J Bioenerg Biomembr, 2008. 40(2): p. 59-67.

164. Ekstrand, M.I., et al., *Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals*. Hum Mol Genet, 2004. 13(9): p. 935-44.
165. Koch, F., *Franziska Koch: Altersabhängige Effekte infolge von metabolischem und oxidativem Stress im B6-mtFVB Mausstamm mit mt-Atp8 Mutation*. . Dissertation. Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2015.
166. Wuchert-Wünnemann, L., *Einfluss einer Cytochrom-c-Oxidase Mutation auf alterungsbedingte Adaptationsvorgänge im organspezifischen Zellstoffwechsel*. Dissertation. Universität Rostock, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, 2014.
167. Meyer, E., *Dualer Effekt der mtND2-Genmutation im Komplex I der Atmungskette: ROS-Generierung und Induktion mitoprotektiver Effekte im Verlauf des Alterungsprozesses*, in Dissertation, Medizinische Fakultät. 2019, Universitätsmedizin Rostock
168. Prentice, R.L., et al., *An exploratory study of respiratory quotient calibration and association with postmenopausal breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. 22(12): p. 2374-83.
169. Matschinsky, F.M., et al., *The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy*. Diabetes, 2006. 55(1): p. 1-12.
170. Iynedjian, P.B., *Molecular physiology of mammalian glucokinase*. Cell Mol Life Sci, 2009. 66(1): p. 27-42.
171. Postic, C., M. Shiota, and M.A. Magnuson, *Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis*. Recent Prog Horm Res, 2001. 56: p. 195-217.
172. Printz, R.L., M.A. Magnuson, and D.K. Granner, *Mammalian glucokinase*. Annu Rev Nutr, 1993. 13: p. 463-96.
173. Altrichter, K., *Einfluss einer Hochfettdiät auf Metabolismus und mitochondriale Funktion in konplastischen Mäusen mit einer COX3-Mutation*, in Dissertation. Medizinische Fakultät. 2018, Universitätsmedizin Rostock.
174. Kaneto, H., et al., *Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis*. Mediators Inflamm, 2010. 2010: p. 453892.
175. Ferre, P. and F. Foufelle, *SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective*. Horm Res, 2007. 68(2): p. 72-82.
176. Ferre, P. and F. Foufelle, *Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c*. Diabetes Obes Metab, 2010. 12 Suppl 2: p. 83-92.
177. Engin, A., *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Adv Exp Med Biol, 2017. 960: p. 443-467.
178. Sookoian, S., et al., *Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha promoter*. Hepatology, 2010. 52(6): p. 1992-2000.
179. Sookoian, S., et al., *Mitochondrial genome architecture in non-alcoholic fatty liver disease*. J Pathol, 2016. 240(4): p. 437-449.

7 Anhang

7.1 Gebrauchsfertige Lösungen und Puffer

| Lösungen und Puffer | Firma |
|---|-------------------------------------|
| 10x PBS | PAA, Cölbe (D) |
| Williams E Medium | Merck, Darmstadt (D) |
| 4x Laemmli Sample Buffer | Bio-Rad, München (D) |
| Odyssey Blocking Buffer (PBS) | Li-COR Biosciences, Bad Homburg (D) |
| Roti®-Mount FluorCare DAPI | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti®-Mount Aqua | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bradford-Reagenz | Carl-Roth, Karlsruhe |
| Prestained protein Standard All Blue Marker | Bio-Rad, München (D) |

7.2 Angesetzte Lösungen und Puffer

MitoSOX-Lösung

50 µg MitoSOX™ (Konzentration pro Reaktionsgefäß)

in 13 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen

ad 197 µl 1 x PBS

Die gebrauchsfertige Lösung (210 µl) reichte für zwei Mäuse. Für je ein Tier wurden 100 µl in einer 1 ml Injektionsspritze aufgezogen. Der Rest der gebrauchsfertigen Lösung wurde verworfen.

Puffer I für die Hepatozytenisolation

| | |
|--|-----------------------------------|
| NaCl | 8,18 g/l (140 mM/l) |
| KCl | 0,35 g/l (4,7 mM/l) |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 g/l (1,2 mM/l) |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,16 g/l (0,65 mM/l) |
| Hepes | 2,38 g/l (10 mM/l) |
| | <i>ad</i> 1000 ml <i>A. dest.</i> |

Der Puffer I wurde vor der Weiterverwendung mit NaOH auf den pH-Wert 7,2 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Puffer II für die Hepatozytenisolation

200 ml Puffer I + 15,22 mg EGTA

Puffer III für die Hepatozytenisolation

100 ml Puffer I + 1 ml CaCl₂ (500 mM)

Die Puffer I-III wurden in 50 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und für mindestens zwei Stunden im CO₂-Schrank begast. Unmittelbar vor der Hepatozytenisolation wurden zum Puffer III 100 mg Collagenase hinzugefügt.

Puffer IV für die Hepatozytenisolation

| | |
|--|----------------------------|
| NaCl | 6,72 g/l (115 mM/l) |
| KCl | 0,35 g/l (4,7 mM/l) |
| KH ₂ PO ₄ | 0,16 g/l (1,2 mM/l) |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,296 g/l (1,2 mM/l) |
| Hepes | 2,38 g/l (10 mM/l) |
| | <i>ad 1000 ml A. dest.</i> |

Der Puffer IV wurde mit NaOH auf den pH-Wert 7,2 eingestellt, autoklaviert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Weiterverwendung gelagert. Dem gekühlten Puffer wurden unmittelbar vor dem Gebrauch folgende Reagenzien hinzugefügt:

| | |
|--------------------|---------------------|
| NaHCO ₃ | 1,68 g/l (20 mM/l) |
| CaCl ₂ | 0,38 g/l (2,6 mM/l) |
| Glucose | 5 ml 1 M |
| Albumin | 2,0 g/l |

modifiziertes Williams E Medium

| | | |
|---------------|----------------------------------|---------|
| Zugabe von: | L-Glutamin (200 mM) | 12,5 ml |
| | Insulin (Insuman Basal 40 IE/ml) | 2,5 ml |
| | 1µM Dexamethasone (2,5 mM) | 20 µl |
| | FCS (5 %) | 25 ml |
| Antibiotikum: | Penicillin/Streptomycin | 12,5 ml |

Oil Red O Färbelösung

0,5 g Oil Red O mit wenigen Milliliter absolutem 1,2-Propandiol auf einem Magnetrührer lösen. Anschließend auf 100 ml mit absolutem 1,2-Propandiol auffüllen, gut durchmischen, auf etwa 95 °C erhitzen und die noch warme Lösung durch einen 25 µm Faltfilter filtrieren. Die gebrauchsfertige Lösung ist mehrfach verwendbar.

7.3 Verwendete Chemikalien

| Chemikalien | Firma |
|--|-----------------------------------|
| Albumin | PAA, Cölbe |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Kollagenase (Collagenase NB 8) | SERVA Electrophoresis; Heidelberg |
| Dexamethason | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| EGTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Life technologies, Carlsbad, USA |
| Glucose | Merck, Darmstadt |
| Heparin-Natrium-5000 | Ratiopharm, Ulm |
| HEPES | Carl Roth, Karlsruhe |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| Ketamin 10 % | Bela-Pharm, Vechta |
| KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |

| | |
|--|----------------------------------|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| MitoTracker® Deep Red FM | Life technologies, Carlsbad, USA |
| MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indikator | Life technologies, Carlsbad, USA |
| NaCl | Carl Roth, Karlsruhe |
| NaHCO ₃ | Merck, Darmstadt |
| Oligomycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Penicillin-Streptomycin | Life technologies, Carlsbad, USA |
| Phosphoenolpyruvat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Pyruvatkinase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| RNase-freies H ₂ O | Qiagen, Hilden |
| Rompun 2 % | Bayer HealthCare, Leverkusen |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen, (D) |
| TaqMan® 2X Universal Master Mix | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Tissue-Tek® O.C.T™ Compound Kryomatrix | Sakura Finetek, Staufen |
| TMRE | Life technologies, Carlsbad, USA |
| Trypanblau | Chemapol, Prag, Tschechien |

7.4 Verwendete Antikörper

| Antikörper | Verdünnung | Firma |
|----------------------|------------|--|
| Anti-Catalase rabbit | 1:2000 | Rockland antibodies & assays, Limerick (USA) |
| Anti-SOD2 rabbit | 1:5000 | Abcam, Berlin (D) |
| GAPDH mouse | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D) |
| GCK(H-88) | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D) |
| β-Actin mouse | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (D) |
| β-Actin rabbit | 1:1000 | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main (D) |
| UCP2 rabbit | 1:500 | Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main (D) |

7.5 Verwendete Genexpressionssonden

Die TaqManGenexpressionssonden stammten jeweils von Life Technologies (Carlsbad, USA).

| Gen-Symbol | Assay-Kennung |
|--|----------------------|
| GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH) | Mm99999915_g1 |
| CAT (Katalase) | Mm01340247_m1 |
| COX1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1) | Mm04225243_g1 |
| COX3 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 3) | Mm04225261_g1 |
| COX5a (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 5a) | Mm00432638_m1 |
| COX6a1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 6a1) | Mm01612194_m1 |
| COX6b1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 6b1) | Mm00824357_m1 |
| DNM1L (Dynamin 1 homologes Protein) | Mm01342903_m1 |
| FIS1 (Mitochondriales Fission Protein 1) | Mm00481580_m1 |
| NDUFB8 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8) | Mm00482663_m1 |
| MFF (Mitochondrialer Fission-Faktor) | Mm00512718_m1 |
| MFN1 (Mitofusin 1) | Mm01289369_m1 |
| MFN2 (Mitofusin 2) | Mm01255785_m1 |
| GPX1 (Glutathione Peroxidase 1) | Mm00656767_g1 |
| OPA1 (Dynamin homologes 120 kDa Protein) | Mm01349716_m1 |
| FASN (Fettsäure Synthase) | Mm00662319_m1 |
| CPT1a (Carnitine-Palmitoyltransferase 1a) | Mm01231183_m1 |
| PCX (Pyruvatdecarboxylase) | Mm00500992_m1 |
| MT-RNR2 (16S RNA) | Mm04260181_s1 |
| GCK (Glucokinase) | Mm00439129_m1 |
| SOD1 (Superoxiddismutase 1) | Mm01700393_g1 |
| SOD2 (Superoxiddismutase 2) | Mm00690588_m1 |
| TFAM (mitochondrialer Transkriptionsfaktor 1) | Mm00447485_m1 |
| PRDX3 (Peroxisredoxin 3) | Mm00545848_m1 |
| UCP2 (Uncoupling Protein 2) | Mm00627599_m1 |
| SREBF-1 (Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1) | Mm00550338_m1 |
| NDUFB4 (NADH Dehydrogenase Ubiquinon 1 Beta Subkomplex 4) | Mm01170081_g1 |
| NDUFA11 (NADH Dehydrogenase Ubiquinone 1 Alpha Subkomplex 11) | Mm01170081_g1 |
| ND5/ND6 (NADH Dehydrogenase Untereinheit 5/6) | Mm04225315_s1 |

| Gen-Symbol | Assay-Kennung |
|--|---------------|
| ND2 (NADH Dehydrogenase Untereinheit 2) | Mm04225288_s1 |
| COX7a2 (Cytochrome-c-Oxidase Untereinheit 7a2) | Mm00438299_m1 |

7.6 Verwendete Kits

| Kit | Firma |
|--|--|
| ATPlite™ Luminescence Assay System | Perkin-Elmer, Waltham (USA) |
| Complex IV Rodent Enzyme Activity MP Assay Kit | Abcam, Cambridge (UK) |
| Maxima™ first strand cDNA synth. kit for RT-qPCR | ThermoFisher Scientific, Waltham (USA) |
| NovaQUANT™ Mouse Mito. to Nuclear Ratio Kit | Merck, Darmstadt |
| QIAmp DNA Mini Kit | Qiagen, Venlo (NL) |
| QuantiPro™ BCA Assay Kit | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Venlo (NL) |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | Life technologies, Carlsbad (USA) |
| TRIGS Kit® | Randox (UK) |

7.7 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Firma |
|---|------------------------------------|
| 96-Well-PCR-Reaktionsplatte (non-skirted) | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| 96-Well-Piko-PCR-Reaktionsplatte | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| Einbetttschälchen „Tissue-Tex® Cryomold Intermediate“ | Sakura Finetek, Staufen (D) |
| Einfrierröhrchen „Cryo.s™“ (2 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen (D) |
| ES-Kompressen, (Gaze) | Paul Hartmann AG, Heidenheim (D) |
| Halb-Mikro-Küvette (1,6 ml, aus Polystyrol) | Sarstedt, Nümbrecht (D) |
| Handschuhe M „Peha-Soft nitril“ | Paul Hartmann AG, Heidenheim (D) |
| MicroAmp™ Optical Adhesive Film | Applied Biosystems™, Lincoln (USA) |
| Mini-PROTEAN® TGX™ Gele | Bio-Rad, München (D) |
| Optical Adhesive Film for Piko PCR plates | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| Pipettenspitzen „Easy Load“ (1000 µl) | Greiner Bio-One, Frickenhausen (D) |
| Pipettenspitzen „epT.I.P.S.“ (5000 µl) | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (D) |
| Pipettenspitzen „Safe Seal Tips“ (10-1000 µl) | Biozym, Hessisch Oldendorf (D) |
| Pipettenspitzen „Tip Stack Pack“ (10-200 µl) | Sarstedt, Nümbrecht (D) |

| Verbrauchsmaterial | Firma |
|---|------------------------------------|
| QIAshredder | Qiagen, Venlo (NL) |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml -, 2 ml) | Sarstedt, Nümbrecht (D) |
| Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen (D) |
| Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs | Bio-Rad, München (D) |

7.8 Geräte

| Geräte | Firma |
|---|------------------------------------|
| Leica CM 1850 Kryostat | Leica Biosystems, Nußloch (D) |
| Fluoview 1000 | Olympus, Hamburg (D) |
| Fluoreszenzmikroskop „Fluoview FV10i“ | Olympus, Hamburg (D) |
| Homogenisator „Precellys® 24“ | VWR, Darmstadt (D) |
| Trans-Bolt Turbo Blotting System | Bio-Rad, München (D) |
| Magnetrührer | IKH-Labortechnik, Staufen (D) |
| pH-Meter | Hanna Instruments, Vöhringen (D) |
| Gelelektrophorese Power Supply 1000/500 | Bio-Rad, München (D) |
| Gelelektrophoresekammer „Tetra Blotting“ | Bio-Rad, München (D) |
| Vortexer „UNIMAG ZX3“ | UniEquip, Planegg (D) |
| Schüttler | IKH-Labortechnik, Staufen (D) |
| Zentrifuge „Biofuge 28RS“ | Heraeus , Hanau (D) |
| Zentrifuge „Biofuge primo R“ | Heraeus , Hanau (D) |
| Zentrifuge „Mikrozentrifuge 5415R“ | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (D) |
| Wärme/Trockenschrank | Memmert, Schwabach (D) |
| Thermomixer compact | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (D) |
| Präzisionswaage | Satorius, Göttingen (D) |
| Analysenwaage | Omnilab, Bremen (D) |
| Spectrophotometer: Ultrospec 2100pro UV-Visible | Amersham Biosciences, Freiburg (D) |
| CO2-Inkubator BB 6220 | Heraeus , Hanau (D) |
| Photometer1420 Multilabel Counter „Victor ³ ™“ | Perkin-Elmer, Waltham (USA) |
| Nanodrop 2000 Photometer | PeqLab-VWR, Darmstadt (D) |
| ADVIA 2120i Hematology System | Siemens Healthineers, Erlangen (D) |
| PikoReal™ Real-Time PCR System | Thermo Scientific, Waltham (USA) |
| Neubauer Zählkammer | Carl Roth, Karlsruhe (D) |

| Geräte | Firma |
|--------------------------------|----------------------|
| Inverses Mikroskop Olympus CK2 | Olympus, Hamburg (D) |

7.9 Software

| Software | Firma |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| AutoQuant X2 image Deconvolution | Media Cybernetics, Rockville, USA |
| FV10-ASW 2.0 | Olympus, Tokio, Japan |
| GraphPad Prism 5 | GraphPad Software, La Jolla; USA |
| NanoDrop 2000/2000c | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| SDS 2.3 | Applied Biosystems, Carlsbad, USA |
| SDS RQ Manager 1.2 | Applied Biosystems, Carlsbad, USA |
| Wallac 1420 Workstation 3 | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| xcellence rt 1.2 | Olympus, Tokio, Japan |
| Image Studio Lite 5.2 | Li-COR Biosciences, Bad Homburg (D) |
| EndNote X9.2 | Clarivate Analytics |

8 Wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Schröder

Geburtsdatum: 21.12.1984

Derzeitige Position: Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Arbeitsplatz: Universität Rostock
Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Adresse: Schillingallee 70, 18057 Rostock, Deutschland

Telefon: 0049-0381-494-5766

Anstellung

seit März 2013

Promotionsstudium an der Universität Rostock

zum Thema:

„Effekte zweier mtDNA-Punktmutationen des OXPHOS-Systems auf die mitochondriale Funktion und den Metabolismus im Alterungsprozess von Mäusen“

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Universität Rostock

(Betreuerin: Prof. Dr. Simone Baltrusch)

Studium

April – Dezember 2012

Masterarbeit

zum Thema: *“Expression und Lokalisation von Globin Y in
Anolis carolinensis (Voigt, 1832)”*

Note 1,7

Oktober 2010 - Dezember 2012

Masterstudium Biologie an der Universität Hamburg

Schwerpunkte: (Molekularbiologie und Biotechnologie),
Gesamtnote 1,48

Februar 2010 – Juli 2010

Bachelorarbeit

Zum Thema: *„Funktionale IGFBP-Diagnostik in Serum-
proben nach Gabe eines IGF-1-basierten Medikamentes“*

Note: 1,1

Oktober 2007 - Oktober 2010

**Beachelorstudium Medizinische Biotechnologie an der
Universität Rostock**

Gesamtnote 2,3

September 2004 - Juni 2007

**Ausbildung zur Medizinsch-Technischen Laboratoriums-
Assistentin an der Universität Greifswald**

Gesamtnote 1,5

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Simone Baltrusch, die mich bei der Bearbeitung meines Promotionsthemas kontinuierlich unterstützte, mir immer mit hilfreichem Rat und konstruktiver Hilfe zur Seite stand und es mir darüber hinaus ermöglichte, an verschiedenen Kongressen teilzunehmen und an interessanten Projekten mitzuwirken.

Weiterhin möchte ich mich auch bei unserem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. Markus Tiedge bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin anfertigen zu können.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Cindy Zehm und an Frau Dr. rer. nat. Mandy Wietzke dafür, dass sie sich immer Zeit für fachliche Fragen und Diskussionen nahmen. Bei Ihnen möchte ich mich auch für das schnelle und konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Ferner möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Annett Kott, Frau Claudia Fahle, Frau Siegrid Giers und Frau Rica Waterstradt für ihre Unterstützung und hilfreichen Anmerkungen bei der Bearbeitung der Experimente bedanken.

Ein persönlicher Dank geht an meine Kollegin und Freundin Frau Dr. rer. nat. Julia Schultz, die für mich sowohl beruflich als auch privat während meiner Promotionszeit immer ein offenes Ohr hatte und mich mit ihrer lebensfrohen Art immer wieder stärkte und motivierte.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken.

Mutti und Papa, danke dass ihr immer für mich da wart und seid, dass ihr mich in meiner gesamten Dissertationszeit immer ermutigt habt, meine Ziele zu verfolgen, und mich, wo ihr konntet, unterstützt habt.

Lars, du hast wohl von mir den meisten Frust mit meinen immer wiederkehrenden Sorgen während meiner Dissertationszeit ertragen müssen. Danke, dass du trotzdem so viel Verständnis dafür zeigtest und mir immer den Rücken freigehalten hast. Ich danke dir für unseren wundervollen Sohn Henning, der während dieser Zeit das Licht der Welt erblickte. Ich liebe euch von ganzem Herzen.